Versuche zur Entstehung und Charakterisierung von Tumor- und Kallusgewebe bei Bryophyllum daigremontianum und Helianthus annuus.

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Volker Kirchhoff
aus Unterlauchringen

1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548921_0062

Versuche zur Entstehung und Charakterisierung von Tumor- und Kallusgewebe bei Bryophyllum daigremontianum und Helianthus annuus.

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Volker Kirchhoff
aus Unterlauchringen

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Januar 1980

Dekan:	Professor Dr. W. Seyffert
1. Berichterstatter:	Professor Dr. B. Schwemmle
2. Berichterstatter:	Professor Dr. A. Hager

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Versuchsobjekte und Methoden	19
2.1	Agrobacterium tumefaciens	19
2.2	Versuchspflanzen	2o
2.3	Das Impfen der Versuchspflanzen	21
2.4	Zell- und Kernvolumenmessung	21
2.5	Histochemische Untersuchungen mit Nilblau	22
2.6	Bestimmung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und einer Phosphodiesteraseaktivität	23
2.7	Versuche mit Theophyllin	26
2.8	Versuche mit Calcium-Ionen	27
2.9	Quantitative Bestimmung von Indolyl-Essigsäure (IES)	27
2.1o	Versuche mit 2,4-Dichlorphenoxi-Essigsäure (2,4-D)	31
2.11	Malatbestimmungen	31
2.12	Versuche mit verschiedenen Beleuchtungsprogrammen	32
3	Ergebnisse	34
3.1	Zell- und Kernvolumen	34
3.2	Nilblaufärbung	38
3.3	Cyclisches Adenosinmonophosphat und Phosphodiesteraseaktivität	4o
3.4	Wirkung von Theophyllin	42
3.5.	Wirkung von Calcium-Ionen	48
3.6	Wirkung von Wuchsstoffen	5o
3.7	Äpfelsäuregehalt im Tumorgewebe	52
3.8	Einfluß von Beleuchtungsprogrammen	55
4	Diskussion und Zusammenfassung	64
5	Literaturverzeichnis	76

1. Einleitung

Das Problem der Tumorentstehung zählt zu den interessantesten Fragen der modernen Biologie. Eines der Merkmale pflanzlicher und tierischer Krebszellen ist, daß ausdifferenzierte Zellen eines Gewebeverbandes so umgewandelt werden, daß sie sich, wie embryonale Zellen oder Zellen in einer Zellkultur, wieder zu teilen beginnen und sich der normalen Wachstums- und Differenzierungskontrolle entziehen. Dadurch kommt es zu einer krankhaften Gewebsvermehrung (HARBERS, 1975). Diese Entdifferenzierung kann meist nicht mehr rückgängig gemacht werden. Da diese grundlegende Eigenschaft sowohl für tierische als auch für pflanzliche Tumorzellen gilt, kann man annehmen, daß die molekularen Grundlagen für die Tumorbildung bei Tier und Pflanze ähnlich oder gleich sind. Deshalb kann die Analyse pflanzlicher Tumore zur Erforschung von Tumoren bei Tier und Mensch beitragen.

Die zentrale Frage bei der Untersuchung des durch Agrobacterium tumefaciens induzierbaren Pflanzenkrebses (Crown gall), ist die nach den Ursachen des unkontrollierbaren Wachstums der Tumorzellen nach den Unterschieden zwischen Tumorzellen, normalen Zellen und Kalluszellen, die für einen begrenzten Zeitraum und kontrolliert in den embryonalen Zustand übergehen, und nach der Kausalität der Tumorentstehung.

Die an Gymnospermen, dicotylen Angiospermen und an einigen wenigen Monocotyledonen beobachteten Wurzelhalsgallen (RIKER et al., 1946, KERSTERS et al., 1973) sind im Gegensatz zu Normal- und Kallusgewebe transplantierbar und wuchsstoffautotroph (SUN, 1969). Der Erreger der Wurzelhalsgallen ist ein Bakterium, das 19o7 von SMITH and TOWNSEND entdeckt und entsprechend seiner Wirkung als "Bacterium tumefaciens" bezeichnet wurde. Es gehört zu der Gattung der Rhizobiaceae, und wird heute Agrobacterium tumefaciens genannt. Mehrere virulente (z.B. B6, C58) und avirulente Stämme (z.B. K84) sind bekannt.

Über die durch Agrobacterium tumefaciens induzierten voll entwickelten Tumoren gibt es zahlreiche gründliche Untersuchungen (BEARDSLEY, 1972; DRLICA and CADO, 1974; HIRT, 1974). Im Gegensatz dazu sind die Primärvorgänge der Tumorinduktion nur unvollständig erforscht. Das hypothetische tumorinduzierende Prinzip (TIP) ist völlig unbekannt. Es wurde schon 1947 von BRAUN definiert als "eine chemische Fraktion der Agrobacterium tumefaciens - Zelle, die befähigt ist, wie z.B. im Falle der Transformation von Pneumococcen, eine spezifische Veränderung der Wirtszelle hervorzurufen, mit dem Ergebnis einer dauernden und abnormen Entwicklung dieser Zellen".

In der Folgezeit wurde immer wieder versucht, die chemische Natur des TIP zu bestimmen. Eine der Annahmen war, daß das TIP eine Nucleinsäure sei, die vom Bakterium auf die Wirtszelle übertragen, diese dadurch dauerhaft zu einer autonomen Crown gall Zelle transformiert. Schon früh wurde festgestellt, daß in einem voll entwickelten Tumor lebensfähige Bakterien nicht mehr notwendig sind (WHITE and BRAUN, 1942; BRAUN and WHITE, 1943; BEARDSLEY, 1972). Außerdem können Zellen aus sterilem Crown gall Gewebe isoliert unbegrenzt auf phytohormonfreiem Medium weitergezogen werden. Dies ist bei Kalluszellen nicht möglich (BRAUN, 1958). Sterile Crown gall Gewebestücke lassen sich auf gesunde Pflanzen transplantieren und wachsen unbegrenzt weiter (BRAUN, 1953). Ob dabei das TIP an gesunde Zellen der Wirtspflanzen weitergegeben werden kann, ist äußerst fraglich, da für derartige Experimente Bakterienfreiheit des transplantierten Gewebes nicht unbedingt garantiert werden kann (MEINS, 1973).

Die Arbeiten von einigen Autoren sprechen dafür, daß das TIP eine übertragbare Einheit ist. AARON-DA CUNHA (197o) bestrahlte Tabaktumore mit 5ooo rad und pfropfte sie auf gesunde Pflanzen. In 5o% der Fälle entstanden in der Nachbarschaft des sterilen absterbenden Gewebes

neue Tumore, offenbar durch die Freisetzung des TIP. KERR (1971) behandelte Pflanzen erst mit virulenten Agrobacterium tumefaciens, dann mit Agrobacterium radiobacter. Beide Bakterienarten lassen sich durch verschiedene Medien voneinander trennen. Nach 42 Tagen isolierte und trennte er die Agrobacterien und stellte fest, daß ein großer Prozentsetz der Agrobacterium radiobacter jetzt in der Lage waren Tumore zu induzieren. Damit schien das TIP auf die bisher nicht virulente aber sehr nahe verwandte Bakterienart übergegangen zu sein.

Die Überprüfung auf Auxinautotrophie und Transplantierbarkeit allein ist noch kein absolut sicheres Anzeichen für Tumorgewebe, denn bestimmte Gewebe entwickeln sich auch ohne Wuchsstoffe (BINNS and MEINS, 1973; FOX, 1963, GAUTHERET, 1955) oder wachsen nach einer Transplantation tumorähnlich weiter (LIMASSET and GAUTHERET, 1950). Nach HARBERS (1975) wird durch die Infektion mit karzinogenen Stoffen der Kontrollmechanismus der Wachstums- und Differenzierungsvorgänge in infizierten Zellen gestört. Da dieser Kontrollmechanismus sich aus verschiedenen Regelkreisen zusammensetzt, kann dessen Funktion durch Eingriffe auf verschiedenen Ebenen beeinflußt werden. Auf diese Weise kann es zu vergleichbaren Reaktionen kommen, unabhängig davon, welche Teile des Kontrollsystems jeweils betroffen sind.

Für eine erfolgreiche Infektion durch das Agrobacterium tumefaciens ist die Verwundung der Pflanze eine notwendige Voraussetzung (BRAUN, 1952). Man nimmt an, daß durch die Verwundung die Zellen für die Umwandlung empfindlich werden. Nach dieser Konditionierungsphase erfolgt innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Bakterien die Anheftungsphase an die Wirtszelle (BEIDERBECK, 1976), und innerhalb von 3 - 1o Stunden die Transformation der Tumorzelle. Danach ist die Anwesenheit der Bakterien nicht mehr notwendig (SUN, 1969). Die Anzahl der Anheftungsstellen ist begrenzt (LIPPINCOTT and LIPPINCOTT, 1969; BEIDERBECK, 1976). Nach BEARDSLEY (1972) werden diese Anheftungsstellen durch die Verwundung freigelegt. Impft man avirulente Bakterien mit virulenten gemeinsam, so vermindert sich der Impferfolg. Nach SCHILPEROORT (1969) reduziert sich die Tumormasse auf 25%, wenn 6 Stunden vor der Inokulation mit Agrobacterium tumefaciens (B6) Agrobacterium radiobacter in der Wunde vorhanden war. Allein schon eine Präparation von Agrobacterium Zellwänden kann nach BEIDERBECK (1973) den Impferfolg vermindern.

Neben hochvirulenten (B6, C58) und avirulenten (K84) sind auch schwach virulente Agrobacterium Stämme bekannt, so entwickeln sich nach Inokulation z.B. mit dem Stamm F4o1 bei bestimmten Wirtspflanzen wenige langsamwachsende Tumoren.

Werden nun diese schwach virulente Stämme zusammen mit nicht virulenten geimpft, so zeigen sich Impferfolge wie bei hochvirulenten Stämmen. Es zeigt sich also hier kein Verdrängungseffekt wie bei Mischexperimenten mit hoch- und avirulenten Stämmen. Es wird vermutet, daß den schwachvirulenten Stämmen möglicherweise ein unbekannter "Anheftungsfaktor" fehlt (LIPPINCOTT and LIPPINCOTT, 1976).

Bis heute ist die Tumorinduktion nur mit vollständigen lebensfähigen Bakterien gelungen. Ihre Teilfraktionen sind einzeln nicht virulent. LIPETZ (1976) konnte durch eine subletale Hitzebehandlung (32°C) den tumorinduzierenden Prozeß während der Induktionsphase abbrechen. HAMILTON and FALL (1971) inaktivierten virulente Bakterien durch eine längere Behandlung mit 37°C. Welcher Teil der Bakterienzelle dabei geschädigt wurde, ist unklar. In Frage kommt vielleicht die Zellwand, die möglicherweise eine Anheftungs- und Überträgerfunktion hat. Unwahrscheinlich ist die Beeinflussung von Nukleinsäuren, da deren thermische Denaturierung erst bei viel höheren Temperaturen eintritt.

Crown gall Gewebe enthält im Gegensetz zu normalem Gewebe größere Mengen der seltenen Aminosäuren Octopin, Nopalin und Lysopin (MÉNAGE and MOREL, 1964; MÉNAGE and MOREL, 1965; BIEMANN et al., 1969).

Die Art der auftretenden seltenen Aminosäuren wird bestimmt durch den verwendeten Bakterienstamm (GOLDMANN et al., 1968; PETIT et al, 197o), der dann befähigt ist, diese seltenen Aminosäuren abzubauen (PETIT et al., 197o). Oft ist das Vermögen Octopin- und Nopalin abzubauen mit der Virulenz des betreffenden Stamms verknüpft (LOIRET, 1957; PETIT and TOURNEUR, 1972). Die seltenen Aminosäuren fördern das Tumorwachstum, wenn sie zusätzlich gegeben werden (LIPPINCOTT et al., 1972). Allerdings kommen seltene Aminosäuren gelegentlich auch in normalem Gewebe vor (JOHNSON et al., 1974; SEITZ and HOCHSTER, 1964). Da Octopin, Nopalin und Lysopin nur schwer nachweisbar sind (BOMHOFF, 1974), ist es nicht verwunderlich, daß ihre Rolle bei der Tumorentstehung bisher nicht eindeutig geklärt werden konnte (JOHNSON et al., 1974).

Unklar ist bislang auch der Übertritt des tumorinduzierenden Prinzips (TIP) von der Bakterienzelle in die Wirtszelle. Eine denkbare Möglichkeit wäre, daß ein Phage das TIP von Agrobacterium tumefaciens in Form einer Nucleinsäure aufnimmt und in der Wirtszelle freisetzt. Entsprechende Arbeiten von LEFF and BEARDSLEY (197o), TOURNEUR and MOREL (197o und 1971), PARSONS and BEARDSLEY (1968) und BEARDSLEY (1972) publiziert. Als sicher gilt, daß bestimmte Phagen Gene transportieren können (CARLSON, 1973; DOY et al., 1973; JOHNSON and GRIERSON, 1974; JOHNSON et al., 1973).

SCHILPEROORT et al., (1969) fanden in der Tat durch Immunreaktionen Phagen-DNA-Sequenzen in Tumorzellen. BEIDERBECK et al. (1973) konnten allerdings mit den gereinigten Phagen PS8 keine Tumore induzieren. Daß mit der Steigerung der Phagenproduktion die Virulenz von Agrobacterium tumefaciens ansteigt, bestätigten HEBERLEIN and LIPPINCOTT (1965, 1967, 1967) und HEBERLEIN (197o). Außerdem wurde festgestellt, daß Extrakte von Agrobakterium bei photosensitiven Stämmen eine Lysis auslösen (PARSONS and BEARDSLEY, 1968; TOURNEUR and MOREL, 197o). Im Inokulum findet man bei Betrachtung im Elektronenmikroskop lysierte Bakterien und freie Phagen (KURKDIJAN, 1969; KURKDIJAN et al., 1968). LEFF and BEARDSLEY (197o) berichteten von einer Tumorinduktion durch Phagen-DNA. Diesen positiven Befunden stehen etliche negative gegenüber. Nach HEBERLEIN (197o) kann die Virulenz von Agrobacterium auch ohne Phagenproduktion gesteigert werden und nach SCHILPEROORT et al. (1973) enthalten platierte Tumore häufig keine Phagen (BRUNNER and POOTJES, 1969; BEIDERBECK, 1972). Die problematische Induktion von Tumoren mit Phagen-DNA kann von BEIDERBEK et al (1973) nicht bestätigt werden. Nach CHILTON et al (1974) können höchstens o,ooo7 - o,oo1% der Tumor-DNA mit der Phagen-DNA homolog sein, also weniger als ein Phagengenom. Damit kann mit einiger Sicherheit ausgeschlossen werden, daß Phagen eine direkte Rolle bei der Tumorinduktion spielen.

Von zahlreichen Autoren (Zusammenfassung z.B. bei DRLICA and KADO, 1975; HIRTH, 1974; LIPPINCOTT and LIPPINCOTT, 1976; BEIDERBECK, 1977) wurde versucht nachzuweisen, daß Teile der Bakterien-DNA in bakterienfreien Tumorezellen enthalten sei. Dazu wurden insbesondere Hybridisierungstechniken verwendet.
Ebenso sollten immunologische Untersuchungen zeigen, daß Nucleinsäuren und damit Proteine von Agrobacterium im Tumorgewebe erscheinen. In der Tat wurden Crossreaktionen zwischen Antigenen und Antikörpern von Agrobacterium und sterilem Tumorgewebe beobachtet, nicht aber zwischen Agrobacterium und normalem Gewebe (SCHILPEROORT et al., 1969;, SCHILPEROORT, 1969; DETOROK and CORNESKY, 1971; CHADHA and SRIVASTAVA, 1971). SCHILPEROORT findet immerhin 3 - 4 für Agrobacterium spezifische Proteine in Tumorgewebe. Da aber auch Normalzellen und habituierte Zellen schon einige Proteine gemeinsam mit Agrobacterium haben (DETOROK and CORNESKY, 1971; DEVAY et al., 197o; BOMHOFF, 1974), sind diese Ergebnisse nicht beweiskräftig. ZAENEN et al. (1974) stellten nun in jüngster Zeit fest, daß in allen virulenten Agrobacterium-Stämmen Plasmide zu finden sind, in den meisten avirulenten Stämmen hingegen nicht. Sie finden verschieden große Plasmide zwischen 96 x $1o^6$ bis 156 x $1o^6$ Dalton. Wird der Stamm C58 bei 37°C avirulent gemacht, verliert er auch sein Plasmid (VAN LAREBEKE et al., 1974).

Virulente Agrobacterien mit Plasmiden sind sensitiv gegen Agrocin, einem Bacteriocin aus Agrobacterium radiobacter, während avirulente Agrobacterien ohne Plasmid keine Agrocinsensitivität zeigen (KERR and HTAY, 1974). Wird der Stamm C58 durch Hitzebehandlung avirulent und verliert sein Plasmid, so ist er auch nicht mehr agrocinsensitiv (SCHELL, 1975). Bisher konnte jedoch kein Plasmid oder Teile davon in der DNA von Tumoren entdeckt werden (CHILTON et al., 1975; KADO and LURQUIN, 1975).

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente hatten das Ziel, die Induktion und die beginnende Entwicklung des durch Agrobacterium tumefaciens ausgelösten Tumorwachstums zu erfassen. Viele Autoren vergleichen altes Tumorgewebe mit Normalgewebe oder mit Wundkallus. Untersuchungen der Tumorentwicklung von der ersten Induktion an sind weit seltener durchgeführt worden (RASCH et al., 1959; KUPILA, 1958; BOPP und LEPPLA, 1964; BROEKAERT and VAN PARIJS, 1973).

Bei der Entwicklung von Crown gall Tumoren ändern sich nicht nur die physiologischen Verhältnisse, sondern auch Morphologie und Histologie des Gewebes. Deshalb werden in einem ersten grundlegenden Teilabschnitt (3.1) Zell- und Kernvolumen von Normal- und Tumorgewebe nach Inokulation mit Agrobacterium tumefaciens verglichen.

Für die histologische und cytologische Untersuchung der frühesten Stadien der Tumorentwiclung müßten einzelne induzierte Zellen mit einem histochemischen Färbeverfahren kenntlich gemacht werden. BASTOS and MARQUES (1972) beschrieben ein Verfahren, mit dem bestimmte Zellorganellen mit Nilblausulfat bei Sarkoma-37 Tumoren bei Mäusen und bei Ehrlich Ascites Tumoren sichtbar gemacht werden können. Diese besitzen eine Succinatdehydrogenaseaktivität, sind negativ für saure Phosphatase, Peroxidasen und Porphyrin. Die Autoren vermuten, daß das Nilblausulfat eine Salzbindung mit ungesättigten Fettsäuren eingeht, und daß es sich bei den beschriebenen Organellen vermutlich um Mitochondrien handelt. Im folgenden wurde nachgeprüft, ob sich derartige Granulae auch in Crown gall Gewebe nachweisen lassen (3.2).

1958 entdeckte EARL W. SUTHERLAND, Jr. das cyclische 3':5' Adenosin Monophosphat (cAMP), das die Funktion eines "second messenger" im Regulationsmechanismus von Organismen hat. Unter anderem am Beispiel des Stärkeabbaus durch α-Amylasen im Gerstenendosperm stellten verschiedene Autoren fest, daß Gibberellinsäure als "first messenger" die cAMP-Synthese induziert (KAMISAKA and MASUDA, 1971; KAMISAKA et al., 1972; GALSKY and LIPPINCOTT, 1969; GILBERT and GALSKY, 1972). Entsprechendes wurde auch für andere Phytohormone gefunden (SALOMON and MASCARENHAS, 1972). Ältere Untersuchungen an Pflanzentumoren zeigen, daß der Gehalt des Tumorgewebes an Auxin erhöht ist (HENDERSON and BONNER, 1952). Es kann auch immer wieder

beobachtet werden, daß tumortragende Blätter von Bryophyllum daigremontianum viel später abfallen als vergleichbare gesunde Blätter. Auch ist das Blatt um das Impffeld herum noch turgeszent, wenn das übrige Blatt schon lange verdorrt ist. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, daß der Phytohormonspiegel im Tumorgewebe höher ist als im Normalgewebe (KARSTEN, 1966; CATARINO and RESEDE, 1966). DAVIES et al. (1975) wiesen außerdem in Crown gall Tumoren die Umsetzung von appliziertem Indol und Tryptophan in IES nach.

Bei tierischen Tumoren spielen die Adenylatcyclase, das 3'÷5'cAMP und eine Phosphodiesterase offenbar ebenso eine Rolle wie beim Wirkungsmechanismus der Hormone (SCHULZ and GARDENER, 1973). Weil Phytohormone bei der Tumorinduktion und beim Tumorwachstum beteiligt sind, lag es nahe, das Vorhandensein und die Wirkung von cAMP als "second messenger" bei Crown gall Tumoren zu untersuchen (LIPPINCOTT and LIPPINCOTT, 1976). Dies schien umso wichtiger, da neuere Untersuchungen das 3'÷5'cAMP als einen "second messenger" für Pflanzenhormone beschrieben (BABULA and GALSKY, 1975; AMES, 1976). Nach BABULA and GALSKY (1975) hemmt cAMP die Bildung von Pflanzenkrebs auf Pintobohnen um 3o% bis 5o%. Eine signifikante Hemmung war jedoch nur innerhalb von 24 Stunden nach der Inokulation zu erzielen.

Außerdem wurde eine Adenylatcyclaseaktivität und eine ansteigende Phosphodiesterase-Aktivität in Crown gall Tumorgewebe gefunden (RAYMOND et al., 1975; RUTHEFORD et al., 1976). Entsprechende Daten waren auch für tierische Tumoren beschrieben worden (ANDERSON et al., 1973; SINGER et al., 1976). DRLICA et al. (1974) fand dagegen keinen Unterschied zwischen dem cAMP-Spiegel von normalem und Crown gall Gewebe bei Vinca rosea. Auch konnte cAMP kein Streckungswachstum bei Avena-coleoptilen induzieren (BREWIN and NORTHCOTE, 1973). Auch der Versuch den cAMP-Spiegel bei Impatiens durch Theophyllin zu erhöhen schlug fehl (KULL and KUEHN, 1975). Eine cAMP Phosphodiesterase, aus Glycine max. extrahiert, zeigte ein pH-Optimum von 4,2, und war durch Methylxanthine zu denen auch Theophyllin gehört, nicht hemmbar (BREWIN and NORTHCOTE, 1973). Die 3':5'cAMP-Phosphodiesterase ist aber durch Methylxanthine hemmbar und hat ein pH-Optimum um 8. Daher widersprachen einige Autoren der Ansicht, daß 3':5'cAMP und seine auf- und abbauenden Emzyme in höheren Pflanzen vorkommen (LIN and VARNER, 1972; AMRHEIN,1974 a,b).

Neuere Untersuchungen zeigen eine ohne Zweifel vorhandene 3':5'cAMP abbauende Aktivität in höheren Pflanzen, die aber nicht nur 3':5'cAMP, sondern auch 2':3'cAMP abbaut (LIN and VARNER, 1972; VANDEPEUTE et al., 1973; AMRHEIN, 1974 a,b; BRENNICKE and FREY, 1977; FREY et al., 1977).

Daher wird vermutet, daß die in höheren Pflanzen vorkommende spezifische Phosphodiesteraseaktivität die Aufgabe hat, die cyclischen Zwischenprodukte des RNA-Abbaus zu spalten (BRENNICKE and FREY, 1977). Um die Rolle von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und einer Phosphodiesteraseaktivität in Crown gall Tumoren zu klären, wurden diese in Normal- und Tumorgewebe nach der Inokulation mit Agrobacterium tumefaciens vergleichend bestimmt (3.3).

Theophyllin hemmt nicht nur bestimmte Phosphodiesteraseaktivitäten, sondern greift auch in die Fusion von Zellmembranen ein. In diesem Zusammenhang sind die Arbeiten von PAUL and GOFF (1973), POSTE and ALLISON (1971, 1973), KAO et al. (1974) und HATANO (197o) von Bedeutung. Theophyllin und andere Oxipurine (Coffein, Aminophyllin), auch Kaffeesäure, setzen Ca^{2+} aus der Zellmembran frei, oder hemmen eine membrangebundene ATPase (PAUL and GOFF, 1973). Durch exogene Gaben von Theophyllin zu verschiedenen Zeiten vor und nach der Inokulation mit Agrobacterium tumefaciens kann durch Messung des Infektionserfolges und des Wachstums des Crown gall Gewebes versucht werden, diese Funktionszusammenhänge zu klären (3.4).

Ebenso scheint die Rolle von Calciumionen in Mangelkulturen bzw. nach Zusatz von bekannten Mengen Ca^{2+} über den Transpirationsstrom Aussagen über den Transformationsvorgang von einer Normalzelle zu einer autonom wachsenden Tumorzelle zuzulassen (3.5).

Crown gall Tumorzellen wachsen auf synthetischen Medien auxinautotroph. Auch im soliden Tumor auf der Wirtspflanze ist, wie bereits erwähnt, der Gehalt an Phytohormonen drastisch erhöht. Bei bestimmten Nicotianahybriden, bei denen sich Tumore besonders leicht induzieren lassen, zeigte sich ein erhöhter Auxinspiegel schon nach der Verletzung. Daraus wurde geschlossen, daß der durch die Verletzung erhöhte Auxinspiegel eine Voraussetzung für die Tumorinduktion sei (BAYER and AHUJA, 1968; BAYER 1972). Exogene Gaben von Phytohormonen mußten dann den Impferfolg verbessern. AMES (197o) stellte fest, daß sich die Anzahl der Tumoren bei solchen Nicotianahybriden durch Gaben von Trijodobenzoesäure (TIBA), einem Hemmstoff des Auxintransports, steigern läßt, obwohl der Auxinspiegel vor dem beginnenden Tumorwachstum sinkt. Eine Gabe von 2 x $1o^{-2}$mmol l^{-} Indolylessigsäure reduziert die Anzahl der induzierten Tumoren signifikant (AMES and MISTRETTE, 1975). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb versucht, die Beeinflussung des Tumorwachstums und die Anzahl der induzierten Tumoren durch Phytohormone nach der Inokulation mit Agrobacterium tumefaciens zu beschreiben (3.6).

Da bei der Wirkung von Indolylessigsäure Protonen beteiligt sein können (HAGER et al., 1971), und diese Protonen möglicherweise aus dem Malatstoffwechsel stammen (HASCHKE, 1976, 1977; HASCHKE und LÜTTGE, 1977 a, b), schien es sinnvoll, das Malat in Tumoren von Helianthus-Hypocotylen und in Bryophyllum daigremontianum Tumoren vergleichend zu

untersuchen (3.7). Helianthus enthält als C-3-Pflanze nur Spuren von Malat, während Bryophyllum daigremontianum mit ihrem diurnalen Säurerhythmus (cyclic acid metabolism, CAM) große Mengen Malat im Tag-Nacht-Rhythmus umsetzt.

Zufällige Beobachtungen zeigten, daß die Zahl der induzierbaren Tumore stark zurückging, wenn die geimpften Pflanzen im Dauerdunkel standen. In diesem Zusammenhang wurden mehrere Versuche zur Tumorinduktion und zum Tumorwachstum im Dauerlicht, Dauerdunkel und bei verschiedenen Licht-Dunkel-Programmen durchgeführt (3.8).

2. Versuchsobjekte und Methoden

2.1 Agrobacterium tumefaciens

Für die hier beschriebenen Versuche wurden zur Induktion von Tumoren Agrobacterium tumefaciens (Familie Rhizobiaceae), Stamm B6, später auch Stamm C58, verwendet. Die Stammkulturen wurden im Kühlschrank bei 4°C auf Normalmedium aufbewahrt. Vermehrt wurde ebenfalls auf Normalmedium aus Fleichextrakt (3g/l), Pepton (5g/l), und Agar von Merck und Difco (15g/l). Die Lösung wurde mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt und 3o Minuten bei 1,5 - 2 bar sterilisiert. Nach dem Überimpfen der Bakterien auf die Platten wurden diese bei 25°C 1-2 Tage bebrütet, bevor sie weiter verwendet wurden. Zum Impfen der Versuchspflanzen wurden die Bakterien mit einem Spatel entnommen und in einer o,9%igen NaCl-Lösung suspendiert. Diese Suspension wurde mit einem Spektralphotometer

(Hitachi, Modell 1o1) bei 66o nm auf einen Titer von $1o^9$ Bakterien/ml eingestellt.

2.2 Versuchspflanzen

2.2.1 Bryophyllum daigremontianum

Bryophyllum daigremontianum (HAMET et PERR) Bgr., syn. Kalanchoe daigremontianum (HAMET et PERR), Familie Crassulacee, wurde in der Regel durch Kopfstecklinge oder durch Brutknospen vermehrt. Durch die rein vegetative Vermehrung war das Material genetisch konstant. Die Aufzucht erfolgte in Gewächshäusern bei 2o - 25°C im Tageslicht, ergänzt durch Zusatzbeleuchtung. Die für die Versuche verwendeten Pflanzen standen in einem Konstantraum bei 25°C und 11 W/m^2 (Osram L 4oW/15).

2.2.2 Helianthus annuus

Helianthus annuus, var. giganteus (Ordnung Asterales, Familie Asteraceae) wurde für die Versuche aus hochwertigem Saatgut (Benary, Hannoversch Münden, Ernte 1972) einzeln in Blumentöpfen aus Samen gezogen. Die Keimlinge wurden etwa im Alter von 8 Tagen nach der Aussaat im Gewächshaus für die Versuche verwendet. Für die Mangelversuche wurden Plastic-Pflanzschalen mit Zellstoff als Substrat ausgelegt und im Konstantraum aufgestellt. Der Zellstoff wurde mit destilliertem Wasser angefeuchtet und darauf die angequollenen Samen ausgelegt. Als Verdunstungsschutz wurde eine zweite Plasticschale darübergestülpt.

2.3 Das Impfen der Versuchspflanzen

Sowohl die Blätter von Bryophyllum daigremontianum als auch die Hypocotylen von Helianthus annuus wurden nach der Methode von BEIDERBECK (197o) geimpft. Zur Verwundung der Pflanzen wurden verschiedene Varianten der "Igel" nach BEIDERBECK (197o) verwendet. In einen Kunststoffblock wurden Insektennadeln der Stärke 0, mit einem Durchmesser von o,16 mm eingelassen. Um Tumorgewebestreifen zu erhalten, diente der "Igel" mit 1o Nadelreihen zu je 6 Nadeln (Abstand der Reihen 3,5 mm, Abstand der Nadeln 1,5 mm). Zur Bestimmung des Impferfolges bei Blättern war der Abstand der Nadeln einheitlich 3,5 mm. Eine spezielle "Igelzange" diente zur Bestimmung des Impferfolges an Hypocotylen von Helianthus annuus (Abstand der drei Nadeln 3,5 mm). Die Pflanzenteile wurden mit dem entsprechenden Igel durchstochen und sofort mit Bakteriensuspension (2.1) bestrichen. Hierzu wurde ein Aquarellpinsel verwendet.

2.4 Zell- und Kernvolumenmessungen

Blätter von Bryophyllum daigremontianum wurden nach der beschriebenen Methode (2.3) geimpft. Als Kontrolle dienten verletzte Blätter (W), sowie verletzte Blätter, die mit einer o.9%igen NaCl-Lösung bestrichen worden waren (W + NaCl). Als Basiswert diente unverletztes Blattgewebe (control).

Die Proben wurden täglich von 1. - 6. Tag nach Inokulation entnommen, sowie am 14. Tag und nach einem Monat. Die Blattstücke wurden sofort in ein Fixiergemisch aus 96%igem Äthanol und Eisessig (1:1) für 2 Stunden gegeben. Dann wurden sie über Isopropanol (2 x 6 Stunden), Isopropanol : Xylol = 3:1 / 1:1 / 1:3, je 6 - 12 Stunden, Xylol (2 x 1o Stunden), Paraffin : Xylol (3 Stufen je 12 Stunden) in Paraplast eingebettet. Von diesen Proben wurden 1o/um dicke Schnitte hergestellt, die mit Safranin/Lichtgrün gefärbt wurden (GERLACH, 1969). Eine Methylgrün-Pyronin Färbung wurde nur für orientierende Versuche verwendet. Die Färbedauer in Safranin betrug 48 Stunden, in Lichtgrün 1o Sekunden. Über die aufsteigende Alkoholreihe wurden die gefärbten Präparate in Eukitt eingebettet. Mit Hilfe eines Okularmikrometers wurde die Größe der Zellen und Zellkerne ermittelt. Etwa 5o Wertepaare aus Länge und Breite je Zelltyp und Tag wurden vermessen, und das Volumen als Rotationsellipsoid berechnet.

2.5 Histochemische Untersuchungen mit Nilblau

Zur Färbung wurden in dieser Arbeit 3o Tage alte Tumore auf Blättern von Bryophyllum daigremontianum verwendet, von denen mit der Rasierklinge Schnitte angefertigt wurden; als Kontrolle dienten Schnitte von unverletzten Blättern. Diese wurden 3o Minuten in einer o,ooo5%igen wässrigen Nilblausulfat-Lösung (Fluka) gefärbt und dann in Glycerin eingebettet. Die Objekte wurden mit einem Zeiss Fluoreszensmikroskop (Erregerfilter I, Sperrfilter 53 oder 5o) untersuch

2.6 Bestimmung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und einer Phosphodiesteraseaktivität

Für diese Versuche wurden Agrobacterium tumefaciens, Stamm B6, sowie Blätter von Bryophyllum daigremontianum verwendet. Die Bakterien wurden wie beschrieben angezogen und eine Suspension von 10^9 Bakterien/ml in 0,9% NaCl hergestellt. Damit wurde nach der Mothode von BEIDERBECK (1970) geimpft. Jedes Blatt wurde beiderseits der Mittelrippe verletzt und 50 µl Bakteriensuspension mit einem Glasstab in die Wunden verteilt. Als Kontrolle dienten in gleicher Weise verletzte Pflanzen, die entweder nur verletzt (W), oder nach der Verletzung mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelt wurden (W + NaCl). Als Bezugsgröße diente unverletztes Gewebe.

Die Pflanzen wurden in dem vorn beschriebenen Konstantraum aufgestellt. Es wurden ausschließlich die Blätter des 3., 4. und 5. Wirtels, von der Gipfelknospe aus gezählt, verwendet.

2.6.1 Cyclisches Adenosinmonophosphat

Die Aufarbeitung des Gewebes für den cAMP-Test wurde nach der Anleitung der Firma Boehringer Mannheim (März 1973) vorgenommen. Aus den Blättern wurden geimpfte Gewebestreifen konisch herausgeschnitten. Für die Probenaufarbeitung wurden ca. 70 mg Gewebe abgewogen, das zwischen den

einzelnen Arbeitsschritten gekühlt aufbewahrt wurde. Die Homogenisierung erfolgte in einem Zellhomogenisator nach Potter Elvehjem mit 6%iger Trichloressigsäure (TCA) unter Eiskühlung (1 ml TCA / 5o mg Gewebe). Nach dem Abzentrifugieren der festen Zellbestandteile (Phywe Tischzentrifuge P6:65oo x g, 2o Minuten) und Ansäuern des Überstandes mit 1n HCl auf o,o5 mol l^{-1} Endkonzentration wird die TCA durch ausäthern mit wassergesättigtem Äther entfernt (4 mal mit den 8fachen Volumen). Die Lösung wird im Rotationsverdampfer eingedampft (Wasserbad 45°C), und der Rückstand mit o,5 ml Aqua bidest / 5o mg Gewebe aufgenommen. Diese Probenlösung wurde bis zum Test tiefgekühlt aufbewahrt.

Zur cAMP-Bestimmung wurde der Radioisotopenverdünnungstest mit 3':5'cAMP bindendem Protein von der Firma Boehringer Mannheim bezogen (Best.Nr. 15289). Mit ihm lassen sich zwischen 1 und 2o pmol cAMP je Probe bestimmen. Der Test beruht auf folgendem Prinzip. Zu X mol cAMP der zu messenden Probe werden A mol ^{3}H-cAMP mit der Aktivität I cpm gegeben (o,8pmol mit ca. 125oo cpm). Von dieser Gesamtmenge wird eine gleich große Menge cAMP, gemischt aus Proben-cAMP und zugestetztem ^{3}H-cAMP, mit Hilfe des cAMP-bindenden Proteins entnommen. Der Protein-cAMP/^{3}H-cAMP-Komplex wird abfiltriert, mit dem Filter in der Szintillationslösung aufgelöst und im Szintillationscounter gemessen. Die entnommene cAMP/^{3}H-cAMP Menge enthält nun um so weniger ^{3}H-cAMP, je mehr cAMP in der Probe enthalten war.

Die Aktivität i_n ist ein Maß für den cAMP Gehalt der Probe. Als Vergleich dient eine Proteinprobe, die mit der maximalen Menge ^{3}H-cAMP beladen war (I_o). Für eine Eichkurve wird der Test mit bekannten Mengen von cAMP durchgeführt. der Quotient I_o/i_n wird gegen die bekannten Mengen cAMP aufgetragen, bzw. für die Quotienten I_o/i_n der Proben mit Hilfe der Eichkurve der cAMP Gehalt der eingesetzten Probenlösung ermittelt.

2.6.2 Phosphodiesteraseaktivität

Aus den Bryophyllum-Blättern werden schmale Gewebestreifen herausgeschnitten und für die Probenaufarbeitung gesammelt, (7o mg Gewebe). Das Gewebe wird mit 5o mM Tris-HCl-Puffer (pH 8) mit 5 mmol l^{-1} $MgSO_4$ (1ml Puffer / 5o mg Gewebe) unter Eiskühlung in einem Zellhomogenisator nach Potter Elvehjem homogenisiert. 1 ml des Homogenats wird in einem Zentrifugenglas mit o,8 pmol ^{3}H-3':5'cAMP (Boehringer-Mannheim) vermischt und sofort bei 37°C für 3o min inkubiert. Die Phosphodiesterase baut das 3':5'cAMP zu 3'-AMP und/oder 5'-AMP ab. Die Reaktion wird im kochenden Wasserbad gestoppt (4 Minuten). Die festen Bestandteile werden bei 25oo g (5 Minuten) abzentrifugiert, und o,5 ml des Überstandes bandförmig auf die Startlinie einer Chromatographieplatte (MN 3oo Zellulose, MACHERY & NAGEL) aufgetragen. Unmarkierte 5'-AMP-Lösung (1o mg 5'-AMP/ml) dient als Vergleichssubstanz. Die Platte wird mit 1 mol l^{-1} Ammoniumacetatlösung und 96% Äthanol (3 : 7) entwickelt.

Das 5'AMP-Band wird unter kurzwelligem UV-Licht identifiziert, ausgekratzt und 5'-AMP mit 4 ml heißem Wasser gelöst. Die Zellulose wird 1-2 Minuten bei 2500 g abzentrifugiert, der Überstand im Szintillationsgläschen mit 2 Teilen Aquasol (New England Nuclear) vermischt und im Scintillationszähler (BECKMANN) gemessen. Die Werte für unverletztes Gewebe (G-Kontrollen) werden gleich 100% gesetzt, um die Daten der anderen Versuche danach beziehen zu können. Die Durchführung erfolgte im wesentlichen nach den Angaben von ROSEN (1970), wobei statt der dort angegebenen Papierchromatographie die Dünnschicht-Chromatographie verwendet wurde.

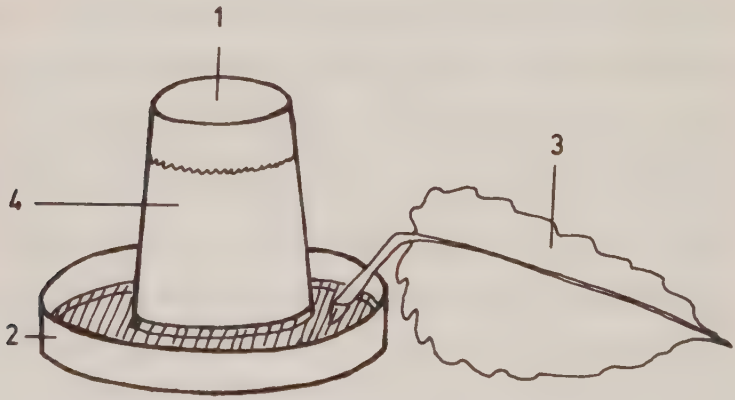

Abb. 1: Die Versuche wurden in einem Konstantraum bei 25°C durchgeführt. Die Blätter wurden 24 Stunden vor dem Impfen ab geschnitten und sofort in Vogeltränken gestellt. Hier wurde Theophyllin in verschiedenen Konzentrationen und für verschiedene Zeitabschnitte nach Inokulation angeboten.

2.7 Versuche mit Theophyllin

Um abgeschnittenen Blättern Theophyllin anzubieten, wurden diese mit ihren Stielen in selbstgebaute Vorrichtungen gesteckt. Sie waren nach dem Prinzip einer Vogeltränke gebaut (Abb. 1).

2.8 Versuche mit Calcium-Ionen

Als Versuchspflanzen dienten 8 Tage alte Keimlinge von Helianthus annuus, die auf Filterpapier mit destilliertem Wasser herangezogen wurden. Auf diese Weise konnte eine gewisse Mineralstoffarmut (auch Ca^{2+}-Mangel) erzielt werden. Die Keimlinge wurden, wie bereits beschrieben, mit der Igelzange an ihrem Hypocotyl verwundet, und mit Agrobacterium tumefaciens, Stamm C58, geimpft. Als Testlösungen dienten $CaCl_2$-Lösungen (1o bis $1o^{-2}$ mmol l^{-1}), sowie Aqua dest. Die Testlösungen wurden alle 2 Tage erneuert. Als Kontrolle wurden gleichaltrige Pflanzen, die in Normalerde wuchsen, herangezogen.

2.9 Quantitative Bestimmung von Indolyl-Essigsäure (IES)

2.9.1 Avenasegmenttest

Hierzu wurden Haferkeimlinge auf besonderen Keimgestellen im Dauerdunkel aufgezogen. Nachdem die Koleoptilen eine Länge von ca. 3 cm erreicht hatten, wurde 5 mm unterhalb der Spitze ein 1o mm langes Stück mit einer Schneidlehre (2 Rasierklingen im Abstand von 1o mm montiert) herausgeschnitten und in die Testlösung gelegt. Zur Erstellung einer Eichkurve wurden wässrige Lösungen von Indolyl-

Essigsäure (IES) als freier Säure in Konzentrationen von 1 bis $1o^{-7}$ mmol l^{-1} in Zehnerpotenzstufen verwendet. Nach 24 Stunden wurde der Längenzuwachs bestimmt. Da der pH schon allein ein säureinduziertes Streckungswachstum hervorrufen kann (HAGER, 1971), wurden die Lösungen gepuffert. Relativ gut eignete sich ein Bernsteinsäurepuffer nach CLINE et al. (1974) mit pH 6, 5o mmol l^{-1}. Blätter und Tumorstücke (jeweils 1 g) wurden mit Äther extrahiert.

2.9.2 Salkowski-Test

Mit dem Reagens nach Salkowski wurde nach GORDON and WEBER (1951) experimentiert. Als Reagens diente 1 ml o,5 mol l^{-1} $FeCl_3$ und 5o ml 35%ige $HClO_4$. 2 ml dieser Reagenslösung wurden mit 1 ml IES als freie Säure in Wasser gemischt, und die Rotfärbung nach 25 min im Spektralphotometer bei 53o nm vermessen. Da eine deutliche Reaktion nur zwischen 1 und $1o^{-2}$ mmol l^{-1} auftrat, erwies sich dieses Verfahren als zu unempfindlich. Dabei muß berücksichtigt werden, daß insbesondere bei frisch induzierten Tumoren nur schwerlich mehr als ein Gramm Gewebe je Probe zu gewinnen ist. Mit dem Reagens nach Salkowsky wurden gleichzeitig auch histologische Färbeversuche vorgenommen. Dazu wurden Handschnitte von alten Tumoren und unverletzten Blättern von Bryophyllum daigremontianum getrocknet, mit Äthanol befeuchtet und mit der Reagenslösung versetzt.

2.9.3 Fluoreszensphotometrische Messungen

Nach STOESSEL and VENIS (197o) soll ihre fluoreszensphotometrische Methode zur IES-Bestimmung um 2 - 3 Zehnerpotenzen empfindlicher sein als der Nachweis mit dem Reagens nach Salkowski. Die Nachweisgrenze liegt dabei um 2oo - 1o /ug je Probe bzw. mit UV angeregter Fluoreszens um 1o - o,oo3 /ug je Probe. Dazu wird die IES haltige Lösung in einem Reagensglas vorsichtig bis zur Trockene eingedampft. Im Eisbad wird das eisgekühlte Reagens aus Essigsäureanhydrid und Trifluoressigsäure (1 : 1) zugegeben. Zum Abstoppen der Reaktion werden nach 15 min 4,5 ml 5%ige Na_2CO_3-Lösung zugegeben. Die Mischung wird im Fluoreszensphotometer (Erregerfilter I, Sperrfilter 5o) sofort vermessen, da das Reaktionsprodukt schnell zerfällt. Die Gewebeextrakte wurden nach den Angaben von STOESSEL and VENIS (197o) hergestellt, wobei anstelle des Filtrationsschrittes zentrifugiert wurde. Hierzu wurden 1 g Gewebe in 2 ml 8o%igem Äthanol homogenisiert, 15 Minuten bei 6ooo/U/min zentrifugiert, der Überstand im Rotationsverdampfer bei 4o°C eingeengt, mit $(NH_4)_2SO_4$ zur Proteinfällung gesättigt, 3o Minuten bei 6ooo U/min zentrifugiert, mit n/1o HCI auf pH 2,5 eingestellt, 3 mal mit 5oo/ul ausgeäthert, und der Ätherextrakt eingedampft. Aus diesen Extrakten fiel ein Niederschlag aus, der die Fluoreszensmessung erheblich störte. Ein Abtrennen des Niederschlages war wegen des schnellen Zerfalls des Reaktionsproduktes nicht möglich.

2.9.4 Bestimmung nach VAN URK

Nach ZIMMERMANN und RÜDIGER (1976) wurden 1 g Blattgewebe in 1o ml siedendem Methanol (Wasserbad bei 7o°C) 5 Minuten erhitzt, homogenisiert (Ultraturrax), noch einmal 5 Minuten im Wasserbad erhitzt, abzentrifugiert (5 Minuten bei 3ooo U/min) und bei -18°C aufbewahrt. Vor dem Auftragen der Extrakte auf die Dünnschichtplatten wurden sie im Rotationsverdampfer eingeengt (Vacuum, 2o°C). Als Adsorbens diente Kieselgel H nach Stahl, Typ 6o (Merck). 25 g wurden in einem Natriumphosphat-Puffer (1/3o mol l^{-1}, pH6) suspendiert und mit einer Schichtdicke von 25 µm aufgetragen. Als Laufmittel wurde Butanon und Hexan im Verhältnis 35 : 65 verwendet. Nach der Chromatographie wurden die Platten 5 Minuten bei 11o°C erhitzt und sofort mit van URK's Reagens besprüht, das aus 1 g Dimethylaminobenzaldeh in 5o ml 36%iger HCl und 5o ml 96%igem Äthanol hergestellt wurde. Nach 24 Stunden war die Farbreaktion weitgehend abgeschlossen und die Platte konnte ausgewertet werden. Als Maßstab für die IES-Konzentration diente die Fleckgröße.

Als photometrischer Test mit van URK's Reagens wurde der wässrige, eingeeingte Extrakt mit Wasser auf o,5 ml aufgefüllt und mit o,5 ml van URK's Reagens versetzt. Gemessen wurde direkt nach der Reagenszugabe und nach 24 Stunden. Der sich bildende Farbstoff hat ein breites Extinktionsband mit einem Optimum bei 58o nm. Der Test wird durch einen roten Farbstoff gestört, der sich aus dem Extrakt nach Zugabe des van URK's Reagens bildet. Die Nachweisgrenze für IES liegt bei 1 µg je Probe.

2.1o Versuche mit 2,4-Dichlorphenoxi-Essigsäure (2,4-D)

Als Versuchspflanzen dienten abgeschnittene Blätter von Bryophyllum daigremontianum, denen die verschieden konzentrierten Testlösungen (2,4-Dichlorphenoxi-Essigsäure 1 bis $1o^{-7}$ mmol l^{-1}) in "Vogeltränken" ab einem Tag vor der Inokulation für verschiedene Zeiträume angeboten wurde (Abb. 1). Zur Tumorinduktion wurde der Stamm B6 ($1o^{9}$ Bakterien/ml) verwendet, wobei der Impferfolg nach dem beschriebenen Igeltest nach BEIDERBECK (197o) (2.3) bestimmt wurde (Auswertung der Versuche nach 14 Tagen).

2.11 Malatbestimmungen

Die Hypocotyle von 8 Tage alten Helianthus-Keimlingen (Anzucht wie beschrieben) wurden mit der Igelzange verwundet und mit Agrobacterium tumefaciens, Stamm C58, (5o/ul, $1o^{9}$ Bakterien/ml in o,9%iger NaCl-Lösung) infiziert. Nach 1 bis 15 Tagen, nach 3 und nach 4 Wochen wurden Proben entnommen und mit 96%igem Äthanol extrahiert (1 ml Äthanol je Gramm Frischgewicht), homogenisiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -18°C aufbewahrt. Als Kontrolle dienten Verwundungen, die mit Agrobacterium tumefaciens, Stamm 542T infiziert waren, der aus dem Stamm 542 hervorgegangen war und sich als avirulent erwiesen hatte. Die Chromatographie erfolgte auf Zelluloseplatten (MN3ooG bzw. MN3oo, Machery & Nagel, 15 g Zellulose in 1oo ml destilliertem Wasser, Schicht-

dicke o,125 mm). Von den Extrakten wurden für den Versuch mit Helianthus-Hypocotylen 5, 1o und 4o µl, für Parallelversuche mit Bryophyllum 1o µl als 1 cm langes Band auf die Startlinie aufgetragen. Um Malat und Citrat auf dem Chromatogramm zu identifizieren, liefen je 5 µl einer o,5%igen Lösung dieser Substanzen als Kontrolle mit. Als Laufmittel dienten Essigsäureäthylester, Ameisensäure und Wasser (5o : 1o : 15). Zur Entwicklung der Substanzflecken wurden nach Trocknung die Platten mit einer o,o4%igen Bromphenolblaulösung in 96%igem Äthanol (pH 8,2) besprüht. Die Malatmenge konnte durch Vergleich der Fleckgrößen bestimmt werden. Zur Bestimmung der Äpfelsäure in Bryophyllum daigremontianum Blättern und Blatt-Tumoren wurden die Pflanzen wenig gegossen und in einem Klimaraum mit Licht von 6.oo bis 2o.oo Uhr bei 25°C und Dunkel von 2o.oo bis 6.oo Uhr bei 15°C gehalten, um einen deutlichen diurnalen Säurecyclus (CAM) zu induzieren. Die Extrakte von normalem Blattgewebe und Tumorgewebe wurden wie bei den Versuchen mit Sonnenblumen gewonnen.

2.12 Versuche mit verschiedenen Beleuchtungsprogrammen

Für diese Versuche wurden Blätter von Bryophyllum daigremontianum und Keimlinge von Helianthus annuus verwendet. Die Versuchspflanzen oder Blätter wurden in Vogeltränken gesteckt (Abb. 1), in denen Wasser bzw. Nährlösungen gegeben werden konnten. Für einige Versuche wurden die Blätter nicht von den Bryophyllum-Pflanzen abgeschnitten.

Für Versuche im Dauerdunkel wurde bei grünem Sicherheitslicht geimpft, obwohl gezeigt werden konnte, daß es ohne Einfluß ist, ob der relativ kurze Impfvorgang bei Sicherheitslicht oder Beleuchtung mit Weißlicht vorgenommen wird. Die Bryophyllum-Blätter wurden einen Tag vor der Inokulation in die Vogeltränke gesetzt, die Helianthus-Hypocotyle erst beim Impfen. Der bereits beschriebenen Methode entsprechend wurde Bryophyllum daigremontianum mit dem "Igel" und Agrobacterium tumefaciens, Stamm B6, geimpft, die Helianthus-Hypocotyle mit der Igelzange und dem Stamm C58. Die Pflanzen im Dauerdunkel wurden mit solchen verglichen, die 14 Stunden Weißlicht (Osram L4o/15, 11W/m^2) je Tag erhielten, oder mit solchen, die im Dauerlicht standen. Ein Unterschied zwischen diesen beiden Kontrollen konnte nicht festgestellt werden. Außerdem wurden verschiedene Licht - Dunkelprogramme, zum Teil kombiniert mit zusätzlichen Zuckergaben in der Vogeltränke durchgeführt. Um zu klären, ob die im Licht gebildeten und zum Impferfolg notwendigen Reaktionsprodukte in der Pflanze transportiert werden können, wurden ältere Pflanzen von Bryophyllum daigremontianum verwendet, bei denen alle Blätter bis auf die der obersten 3 Wirtel entfernt wurden. Die Höhe der Pflanzen betrug in diesem Falle 3o-4o cm. Verletzt wurde durch einen "Igel" mit 1o Nadeln in der Mitte der Sproßachse. Infiziert wurde mit Agrobacterium tumefaciens, Stamm B6. Für die Versuche wurden bei einer

Gruppe von 12 Pflanzen die Blätter und die Sproßachse mit Ausnahme des geimpften Bereichs mit Aluminium-Folie umwickelt. Bei einer weiteren ebenso großen Gruppe (12) wurde nur die Sproßachse einschließlich der Impfstelle mit Aluminiumfolie, die Blätter aber mit durchsichtigem Zellophan eingehüllt, um dort Effekte, die allein durch das Einwickeln hervorgerufen werden, auszuschalten. Geimpft wurde 1 Tag nach dem Einwickeln in Sicherheitslicht. Als Kontrolle dienten Pflanzengruppen, die dauernd im Licht bzw. dauernd im Dunkeln blieben, und auch entsprechend geimpft wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Zell- und Kernvolumen

Das Kernvolumen der Kalluszellen von W- und W+NaCl-Kontrollgewebe (siehe Methoden 2.4) nimmt innerhalb von 14 Tagen nach der Verletzung von 5×10^{-7} mm^3 auf 1,2 bis 1,5 x 10^{-7} mm^3 ab. Dies gilt auch für Wundkallus nach Inokulation mit Agrobacterium tumefaciens. Hier finden sich aber hinter dem Wundkallus besonders am 3. und 4. Tag nach der Inokulation Zellen mit sehr großen Kernen ($12 \times 10^{-7} mm^3$). Im Laufe der weiteren Tumorentwicklung verschwinden diese Riesenkerne wieder. Nach 14 Tagen erreichen sie nur noch ein mittleres Volumen von 4 x 10^{-7} mm^3, nach einem Monat sogar nur 1,7 x 10^{-7} mm^3 (Abb. 2).

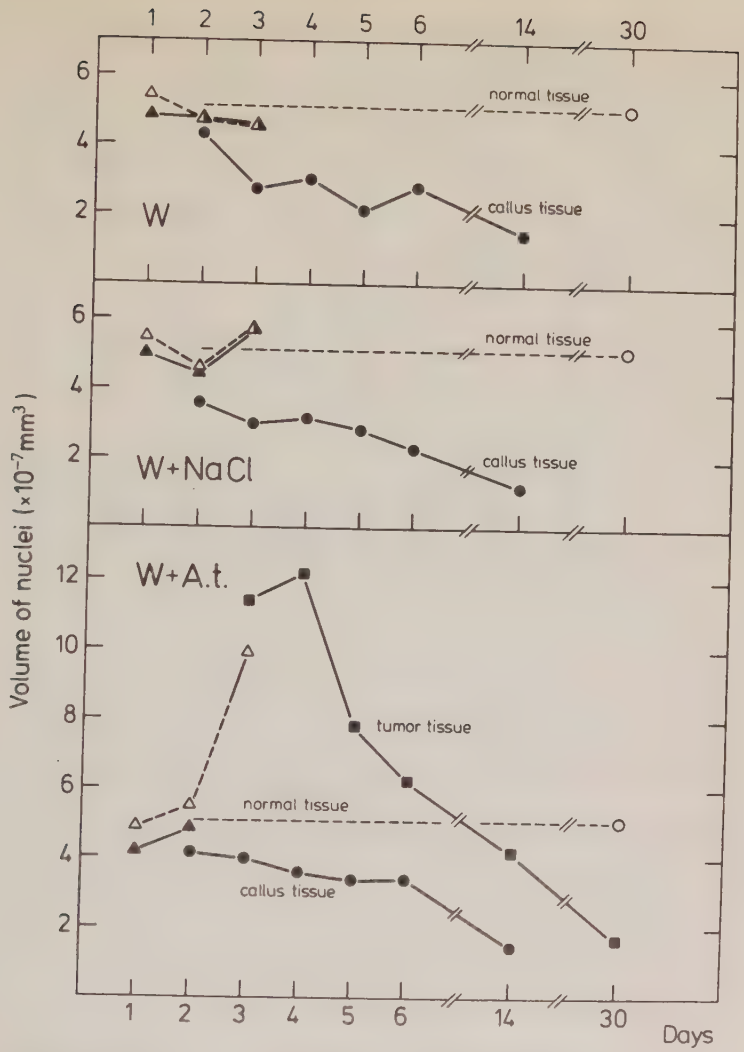

Abb. 2: Kernvolumina zwischen dem 1. und 3o Tag nach Inokulation mit Agrobacterium tumefaciens (W + A.t.), Verwundung (W) und Verwundung mit NaCl o,9%ig (W + NaCl), bei Tumorgewebe (tumor tissue), Kallusgewebe (callus tissue) und Normalgewebe (normal tissue). Die verschiedenen Symbole bedeuten: 1. Zelle neben dem Einstich (▲), 2. bis 4. Zelle neben dem Einstich (△), Tumorgewebe (□), Kallusgewebe (●), Normalgewebe (○). Bemerkenswert ist die starke Volumenzunahme der Zellkerne im Tumorgewebe am 3. und 4. Tag nach der Inokulation.

Das Zellvolumen von entsprechendem Kontrollgewebe, bei dem Kallusbildung beobachtet wurde, ergibt im Prinzip ein vergleichbares Ergebnis (vergl. Abb. 4). Dies gilt auch für das Kallusgewebe von geimpften Blättern. Das Volumen der Tumorzellen liegt jedoch doppelt so hoch wie das Volumen von Kalluszellen.

Bildet man den Quotienten von Kernvolumen zu Zellvolumen, so zeigt sich bei den Kontrollgeweben "W" und "NC", die in ihrer Reaktion praktisch identisch sind, daß das Verhältnis etwa dem des Normalgewebes (control) entspricht, und nur während des 3. bis 5. Tages etwas erhöht ist. Bei den mit Agrobacterium tumefaciens geimpften Proben verdoppelt sich der Quotient am 3. Tag sowohl bei Kallus- (C) als auch bei Tumorgewebe (T). Dieser erhöhte Wert wird bis zum 14. Tag beibehalten, um sich dann bis zum Ende des ersten Monates noch einmal zu verdoppeln. Um einen besseren Überblick über die Meßdaten zu erhalten, wurden die Werte in Größenklassen eingeteilt und in Diagramme eingetragen (Abbildungen 3 und 4). Aus ihnen läßt sich die Entwicklung der Kernvolumina (Abb. 3) und die Entwicklung der Zellvolumina (Abb. 4) vom 1. bis 3o. Tag nach Verletzung bzw. Inokulation mit Agrobacterium tumefaciens ablesen.

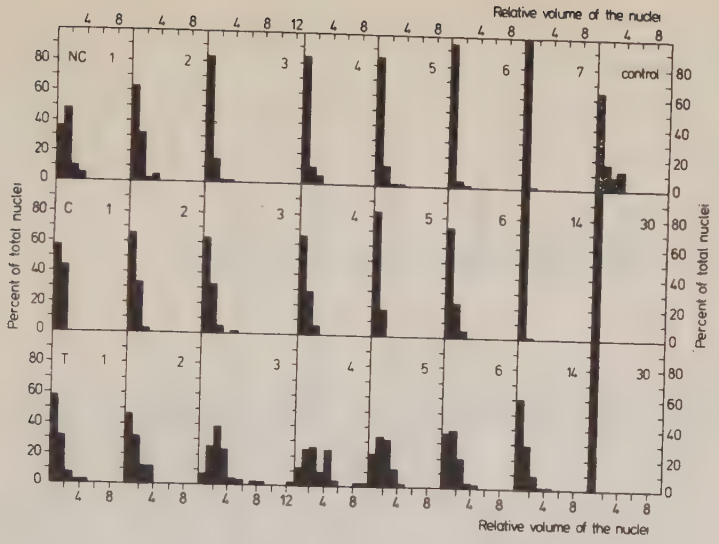

Abb. 3: Entwicklung der Kernvolumina vom 1. bis 3o. Tag nach Verletzung bzw. Inokulation mit Agrobacterium tumefaciens. Angegeben ist das relative Kernvolumen in Prozenten für festgelegte Größenklassen.
Die Abkürzungen bedeuten: Verletzung und Zugabe von NaCl o,9%ig (NC), Kallusgewebe (C), und Tumorgewebe (T) und Normalgewebe (control).

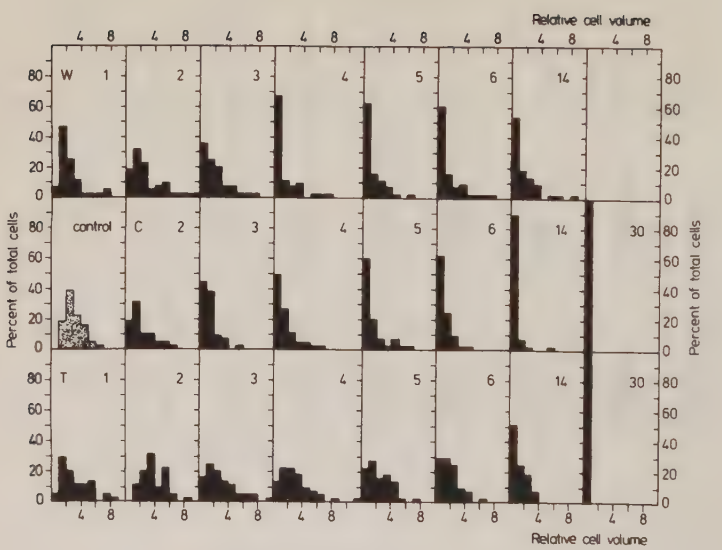

Abb. 4: Entwicklung der Zellvolumina vom 1. bis 3o Tag nach der Verletzung bzw. Inokulation mit Agrobacterium tumefaciens. Angegeben ist das relative Zellvolumen in Prozenten für festgelegte Größenklassen.
Die Abkürzungen bedeuten: Nur Verwundung (W), Kallusgewebe (C) und Tumorgewebe (T), sowie Normalgewebe (control).

3.2 Nilblaufärbung

Nach Färbung mit Nilblau kann im Tumorgewebe ein gehäuftes Vorkommen von gelbgrünen bis türkisfarbenen fluoreszierenden Granulae in den Zellen beobachtet werden, die schon im Hellfeld als schwarze Punkte zu sehen sind (Vergrößerung 45o fach). Bei der Untersuchung von normalem Blatt-

mesophyllgewebe stellt sich heraus, daß diese fluoreszierende Granulae auch in den Geleitzellen der Leitbündel von Bryophyllum daigremontianum auftreten. Tumorpräparate zeigen, daß an den Stellen, an denen die fluoreszierenden Granulae gehäuft auftreten, Leitbündel den Tumor durchziehen. Damit ist die Nilblaufärbung in diesem Falle nicht spezifisch für Crown gall Tumorzellen.

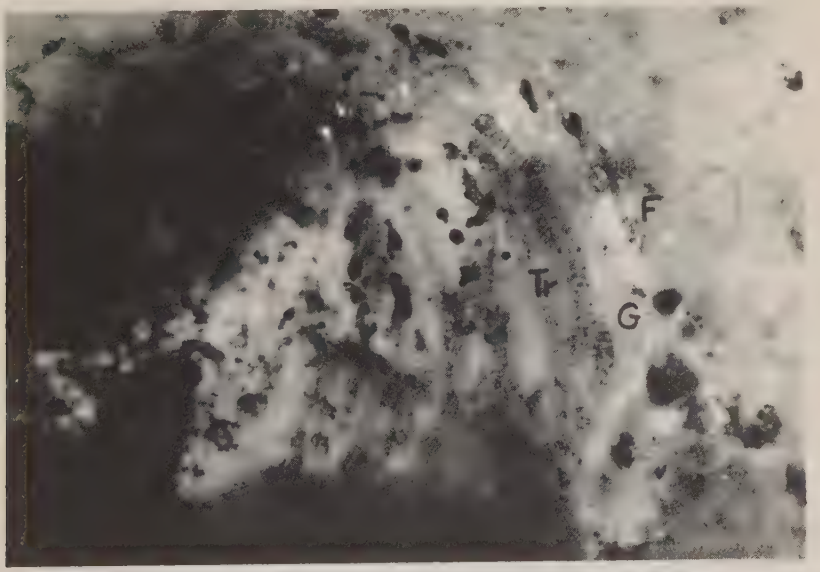

Abb. 5: Schnitt durch Tumorgewebe von Bryophyllum daigremontianum, das mit Nilblau gefärbt wurde. in der rechten Bildhälfte ist ein Leitbündel zu sehen mit Tracheen (Tr.). Im Bereich des Phloems (Geleitzellen, G) erscheinen als helle Stellen fluoreszierende Bezirke (F).

3.3 Cyclisches Adenosinmonophosphat und Phosphodiesteraseaktivität

Da sich die Ergebnisse der W - und W+NaCl - Kontrollen (siehe Methoden (2.6)) nur unwesentlich unterscheiden, wurden sie zu einer gemeinsamen Kontrolle für verletztes Gewebe (wound tissue) zusammengefaßt (vergl. Abb. 6). Am ersten Tag nach der Verletzung zeigt sich ein Aktivitätsanstieg der Phosphodiesterase, der ab dem 2. Tag wieder auf Werte wenig über der Aktivität von Normalgewebe (normal tissue) zurückgeht (vergl. Abb. 6). Die Phosphodiesteraseaktivität im Tumorgewebe steigt dagegen bis zum 5. Tag an, bleibt dann aber nicht auf diesem hohen Niveau, sondern fällt langsam bis zur 5. Woche nach Inokulation wieder bis auf Werte des Normalgewebes ab. Bei der Berechnung der angegebenen Daten wurde vorausgesetzt, daß neben dem zugegebenen Substrat (^{3}H-3':5'cAMP) kein anderes Substrat aus dem Gewebe umgesetzt wird.

Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) wurde in Tumorgewebe von Bryophyllum daigremontianum vom 1. Tag bis 2,5. Monat nach Inokulation mit Agrobacterium tumefaciens mit Hilfe eines Radioisotopentests (Firma Boehringer Mannheim) bestimmt. Dabei zeigen sich insbesonders in der ersten Woche nach der Verletzung bzw. Inokulation erhöhte cAMP-Werte für das Tumorgewebe und die Kontrolle (Abb. 7). Offensichtlich wurde dabei aber nicht 3':5' cAMP erfaßt, sondern 2':3' cAMP, ein RNA-Abbauprodukt, das in höheren

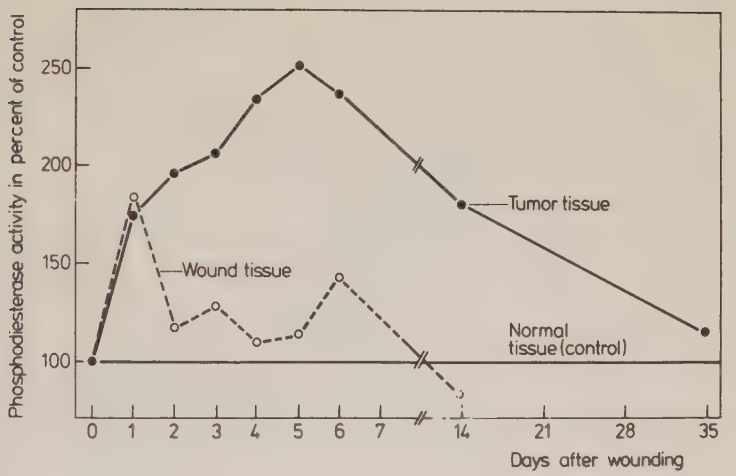

Abb. 6: Die Aktivität einer Phosphodiesterase im Gewebe nach Verwundung (wound tissue) und Tumorgewebe (tumor tissue) in Abhängigkeit von der Zeit nach der Verwundung bei Bryophyllum daigremontianum. Die Daten sind angegeben in Prozenten bezogen auf die Phosphodiesteraseaktivität im Normalgewebe (normal tissue, control).

Pflanzen vorkommt (AMRHEIN, 1974). Das im Testsatz verwendete cAMP-bindende Protein unterscheidet nicht zwischen 3':5' cAMP und 2':3' cAMP. Die in der Abbildung 7 dargestellten Ergebnisse dürfen nur unter diesen Prämissen diskutiert werden.

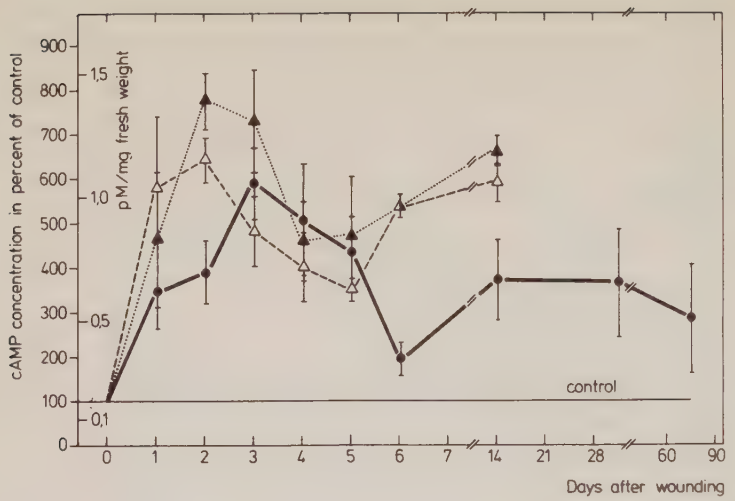

Abb. 7: Gehalt an cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in Tumorgewebe von Bryophyllum daigremontianum in Abhängigkeit von der Zeit nach der Verwundung ( ). Die Daten sind angegeben in Prozenten bezogen auf den Gehalt an cAMP in Normalgewebe (control). Außerdem wurden die Werte für verwundetes Gewebe ohne ( ) und mit NaCl o,9%ig ( ) eingezeichnet.

3.4 Wirkung von Theophyllin

Abgeschnittenen Blättern von Bryophyllum daigremontianum wurden vom 1. Tag vor der Inokulation bis zum 14. Tag danach Theophyllin in Konzentrationen von 1o mmol l^{-1} bis $1o^{-5}$ mmol l^{-1} angeboten. Als Kontrolle dienten abgeschnittene Blätter in Wasser (C_2-Kontrolle) und Blätter an Pflanzen (C_1-Kontrollen). Da die beiden Kontrollgruppen fast gleich reagierten, wurden sie in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

Eine deutliche Verminderung des Impferfolges ergibt sich bei 1o mmol l^{-1} Theophyllin gegenüber der Kontrolle. Eine

Tab. 1: Wirkung von Theophyllin auf die Anzahl der Tumoren in Prozenten. Ausgewertet wurde 14 Tage nach der Inokulation. In der Tabelle wurden die Mittelwerte und die mittleren Fehler eingetragen.

Theophyllin in mmol l^{-1}	Anzahl der Tumoren in Prozenten
$1o$	$52 \pm 4,8$
1	$74 \pm 2,6$
$1o^{-1}$	$79 \pm 6,5$
$1o^{-2}$	$8o \pm 3,o$
$1o^{-3}$	$84 \pm 3,3$
$1o^{-4}$	$91 \pm 2,3$
$1o^{-5}$	$92 \pm 2,6$
H_2O-Kontrolle	$85 \pm 2,2$

leichte Steigerung des Impferfolges ist bei $1o^{-4}$ und $1o^{-5}$ mmol l^{-1} zu beobachten. Da nicht nur nach 14 Tagen, sondern regelmäßig jeden Tag nach der Inokulation die Anzahl der vorhandenen Tumoren ausgezählt wurde, kann die Entwicklung der Tumoren aus der Darstellung in Abb. 8 entnommen werden.

Um festzustellen, zu welchem Zeitpunkt Theophyllin am wirksamsten ist, wurde einem Teil der Blätter Theophyllin nur vom 1. Tag vor bis zum 2. Tag nach der Inokulation angeboten, dann Wasser bis zur Auswertung am 14. Tag. Einer anderen Versuchsgruppe wurde zuerst Wasser, dann ab dem 2. Tag nach der Inokulation Theophyllin angeboten. Als Kontrollen dienten abgeschnittene Blätter in Wasser, die, wie beschrieben, geimpft wurden.

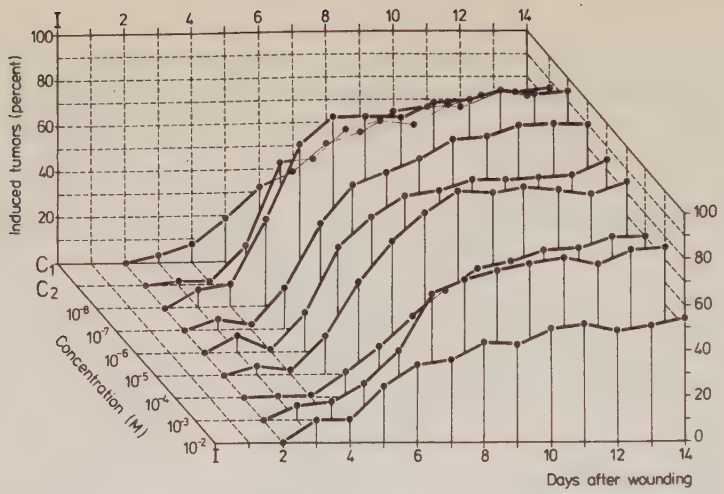

Abb. 8: Entwicklung der Anzahl der Tumoren in Prozenten in Abhängigkeit von der Konzentration an Theophyllin. Das Theophyllin wurde den Blättern von Bryophyllum daigremontianum vom 1. Tag vor der Inokulation (I) beginnend angeboten.

Tab. 2: Wirkung des Theophyllins auf die Anzahl der Tumoren in Prozenten. Auswertung 14 Tage nach der Inokulation. Wasser und Theophyllin (1 und 10 mmol l^{-1}) wurden am 2. Tag nach der Inokulation ausgetauscht. Es bedeuten Th-H_2O: zuerst Theophyllin, dann Wasser; H_2O-Theophyllin: zuerst Wasser, dann Theophyllin. Angegeben sind Mittelwerte und mittlere Fehler.

Theophyllin mmol l^{-1}	Th - H_2O	H_2O - Th	Kontrolle
10	32 + 3,6	88 + 2,4	90 + 2,1
10	32 + 8,9	88 + 7,0	89 + 4,0
1	74 + 2,7	83 + 2,2	87 + 1,0
Austausch am 3. Tag nach der Inokulation:			
1	92 + 4,0		94 + 2,0
Austausch am 3. Tag nach der Inokulation:			
1	65	67	72

1 mmol l^{-1} Theophyllin ist offensichtlich zu wenig konzentriert, um, über den Transspirationsstrom angeboten, eindeutige Effekte zu erhielen. Die weiteren Versuche wurden deshalb mit 1o mmol l^{-1} Theophyllin durchgeführt. Diese Konzentration hemmt die Tumorinduktion in den ersten beiden Tagen nach der Inokulation recht stark, das Tumorwachstum jedoch kaum. In der Abb. 9 ist dieses Ergebnis festgehalten.

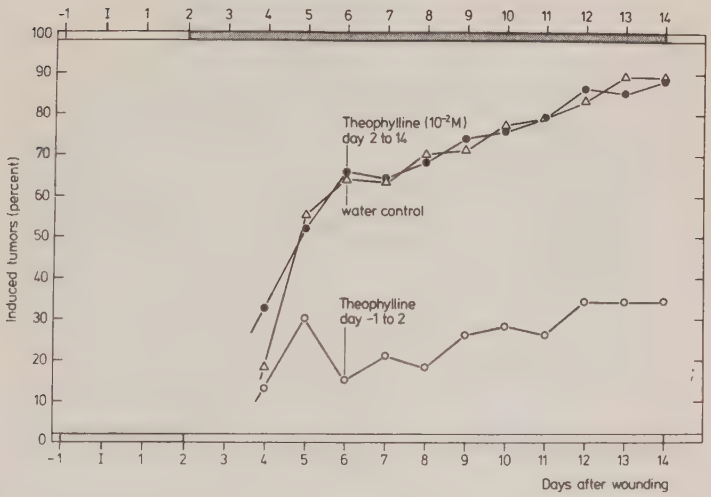

Abb. 9: Wirkung von 1o mmol l^{-1} Theophyllin vom 1. Tag vor der Inokulation bis zum 2. Tag danach, bzw. vom 2. Tag danach bis zur Auswertung am 14. Tag auf die Anzahl der Tumoren in Prozenten. Die grauen Balken geben die Dauer der Theophyllingaben an. I = Zeitpunkt der Inokulation von Bryophyllum daigremontianum mit Agrobacterium tumefaciens.

Um genauer Angaben darüber machen zu können, zu welchem Zeitpunkt Theophyllin am wirksamsten ist, wurden Blätter zu verschiedenen Zeiten bezogen auf die Inokulation für 24 Stunden Theophyllin gegeben (Theophyllinpulse). Die Theophyllinpulse wurden, vom Tag der Inokulation beginnend, bis zum 4. Tag danach um jeweils 12 Stunden versetzt (Abb. 1o und Abb. 11, Tab. 3). Bei der Bewertung der Er-

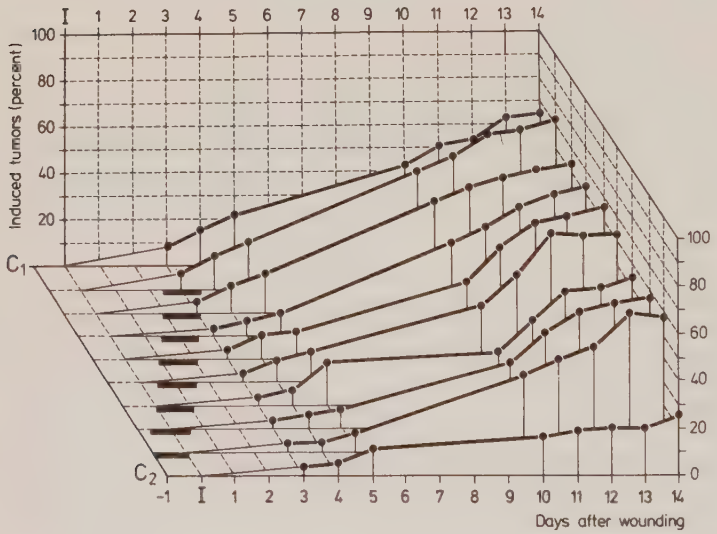

Abb. 1o: Entwicklung der Anzahl der Tumoren in Prozenten nach 24-stündigen Theophyllin-Pulsen zu verschiedenen Zeiten vor und nach der Inokulation von Bryophyllum daigremontianum Blättern mit Agrobacterium tumefaciens. Die Theophyllinkonzentration, die dem Transpirationsstrom angeboten wurde, betrug 1o mmol l^{-1}. C_1: Kontrolle ohne Theophyllin, C_2: Theophyllin Dauerangebot, I: Zeitpunkt der Inokulation. Die schwarzen Balken geben die Lage der Theophyllin-Pulse an.

gebnisse muß berücksichtigt werden, daß durch den verwendeten Agrobacterium Stamm nicht die optimalen Impferfolge um 9o% zu erzielen waren. Die maximale Wirkung des Theophyllinpulses liegt zwischen dem ersten Tag vor und dem ersten Tag nach der Inokulation. Außerdem liegt der Impferfolg bei einer Theophyllingabe nach dem ersten und zweiten Tag deutlich über dem der Wasserkontrolle (Tab. 3).

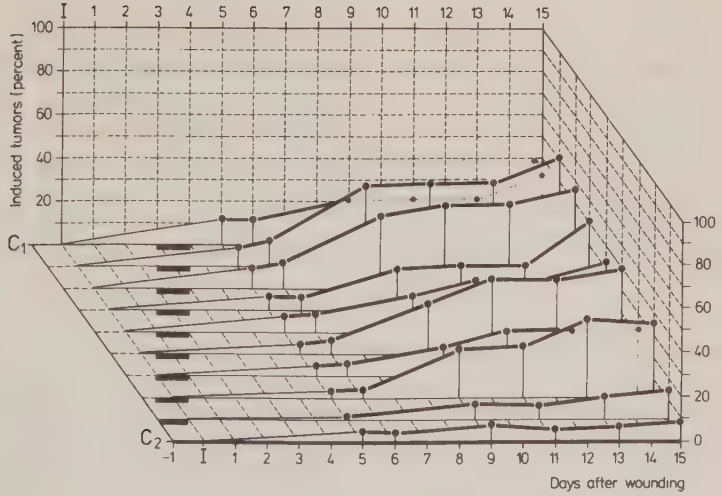

Abb. 11: Wie Abb. 1o, jedoch zu einem anderen Zeitpunkt als Parallelversuch durchgeführt.

Tab. 3: Die Wirkung von Theophyllinpulsen (1o mmol l^{-1}, 24 Stunden Dauer) auf die Anzahl der Tumoren. Ausgewertet 14 Tage nach der Inokulation. Angegeben werden die Mittelwerte und der mittlere Fehler von zwei unabhängigen Versuchen.

Lage des Pulses bezogen auf die Inokulation (Tage)	Versuch 1	Versuch 2
-1 bis ±o	14,6 ± 5,5	56,1 ± 6,2
-o,5 bis +o,5	34,4 ± 4,o	54,1 ± 4,7
±o bis +1	21,9 ± 4,4	52,7 ± 2,5
+o,5 bis +1,5	38,9 ± 3,8	61,6 ± 1,2
+1 bis +2	32,3 ± 3,6	63,1 ± 4,o
+1,5 bis + 2,5	41,5 ± 4,9	63,1 ± 4,7
+2 bis +3	45,7 ± 6,3	62,1 ± 7,o
+ 2,5 bis + 3,5	5o,9 + 4,6	---
+2,5 bis +4	---	71,2 ± 6,1
Wasserkontrolle	32,3 ± 6,7	65,o ± 3,9
Theophyllindauergabe	9,2 ± 3,9	24,8 ± 5,4

3.5 Wirkung von Calcium-Ionen

Um die Wirkung von Calciumionen bei der Tumorinduktion zu untersuchen, wurde Ca^{2+} in verschiedenen Konzentrationen mit dem Transpirationsstrom jungen Keimlingen von Helianthus annuus angeboten. Da Ca^{2+}-Mangelkulturen angelegt wurden, waren die Versuchspflanzen etwas schwächer entwickelt als die Kontrollpflanzen. Mit steigender Ca^{2+}-Konzentration wird das Aussehen und die Größe der Pflanzen besser. Das gilt auch für den Impferfolg.

Tab. 4: Wirkung von Ca^{2+} auf die Anzahl der Tumoren in Prozenten. Das Ca^{2+} wurde in Form von $CaCl_2$ mit dem Transpirationsstrom angeboten.

$CaCl_2$ mmol $^{-1}$	Anzahl der Tumoren in Prozenten	
	nach 6 Tagen	nach 12 Tagen
1o	39	61
1	56	61
$1o^{-1}$	6	6
$1o^{-2}$	22	22
Wasserkontrolle	6	28
Pflanzen in Erde	9o	1oo

Nach der Tabelle 4 scheint die optimale Ca^{2+}-Konzentration zwischen 1o und 1 mmol l^{-1} zu liegen. Der minimale Impferfolg bei $1o^{-2}$ mmol l^{-1} könnte durch die relativ geringe Zahl der Versuchspflanzen zu erklären sein (n=6). Der Versuch zeigt jedoch deutlich, daß Ca^{2+} bei diesen rasch wachsenden Hypocotylen verstärkt benötigt wird, und daß allein durch Ca^{2+}-Gaben Wachstum und Impferfolg verbessert werden können. Diese Ergebnisse stützen die Aussage von PAUL and GOFF (1973), POSTE and ALLISON (1971, 1973), daß Ca^{2+}-Mangel dieMembranfusion und die Zellteilungsaktivität beeinflussen.

Um mögliche Kalium- und Phosphatmangelerscheinungen auszuschließen, wurden die $CaCl_2$-Lösungen zusammen mit 1 mmol l^{-1} KH_2PO_4/K_2HPO_4-Puffer, pH 6 angesetzt.

Tab. 5: Wirkung von Ca^{2+} zusammen mit K^+ und PO_4^{3-} auf die Anzahl der Tumoren in Prozenten. Ca^{2+} wurde als $CaCl_2$, K^+ und PO_4^{3-} in Form eines 1 mmol l^{-1} KH_2PO_4/ K_2HPO_4 - Puffers, pH 6, angeboten.

$CaCl_2$ mmol l^{-1}	Anzahl der Tumoren in Prozenten nach 7 Tagen	nach 1o Tagen
1o	11	48
1	23	1o
$1o^{-1}$	11	1o
$1o^{-2}$	7	1o
Puffer ohne Ca^{2+}	4	4
Pflanzen in Erde	83	83

Das Verhältnis der Einzelwerte nach Tabelle 5 entspricht dem des bereits beschriebenen Versuchs (Tabelle 4). Die Anzahl der induzierten Tumoren hängt jedoch von vielen variablen Faktoren ab, z.B. von der Virulenz der Bakterien des gerade verwendeten Bakterienstammes, von der genauen Konzentration der Bakteriensuspension, und von der Pflanzenpopulation, sodaß die absoluten Prozentwerte zweier Versuche nur sehr bedingt miteinander vergleichen werden können.

3.6 Wirkung von Wuchsstoffen

Die Beeinflussung der Anzahl induzierter Tumoren durch Wuchsstoffe wurde bei abgeschnittenen Blättern von Bryophyllum daigremontianum geprüft. Dazu wurde den Blättern vom 1. Tag vor der Inokulation bis zum 14. Tag nach der Inokulation 2,4 Dichlorphenoxi-Essigsäure (2,4-D) in

verschiedenen Konzentrationen über die Vogeltränken (siehe Methoden (2.7), Abb. 1) angeboten. Nach 14 Tagen wurde der Impferfolg bestimmt (vergl. Tabelle 6).

Tab. 6: Anzahl der induzierten Tumoren an Blättern von Bryophyllum daigremontianum in Abhängigkeit von der über Vogeltränken zugegebenen 2,4-Dichlorphenoxi-Essigsäure-Konzentration. Die Auszählung der Tumore erfolgte 14 Tage nach der Inokulation. Angegeben wurde die Anzahl der Tumore in Prozenten, bezogen auf die mit Agrobacterium tumefaciens inokulierten Wunden.

2,4-D (mmol l^{-1})	Anzahl der Tumoren in Prozenten
$1o^{-1}$	5,9
$1o^{-2}$	73,5
$1o^{-3}$	76,9
$1o^{-4}$	81,1
$1o^{-5}$	77,7
$1o^{-6}$	82,3
$1o^{-7}$	97,9
H_2O-Kontrolle	81,6

Parallelversuche mit Indolyl-Essigsäure (IES) zeigten keinen messbaren Effekt. Wahrscheinlich wurde die IES oxidativ abgebaut, und deshalb gar nicht erst aufgenommen, oder nicht zu den Impfstellen transportiert. Hohe 2,4-D-Konzentrationen hemmen die Anzahl der induzierten Tumoren deutlich. Die leichte Förderung der Tumorentwicklung durch $1o^{-7}$ mmol l^{-1} 2,4-D läßt sich jedoch statistisch nicht absichern.

3.7 Äpfelsäuregehalt in Tumorgewebe

Mit den beschriebenen chromatographischen Methoden lassen sich in Normalgewebe von Helianthus annuus keine nennenswerten Äpfelsäuremengen nachweisen. Dagegen konnte diese in Extrakten von Tumoren auf Helianthus annuus Hypocotylen bestimmt werden. Bei Platten mit 5 µl Extrakt je Startfleck zeigen sich die ersten Malatspuren 12 Tage nach der Inokulation, bei Platten mit 10 µl Extrakt je Startfleck bereits nach 8 Tagen, bei Platten mit 40 µl Extrakt je Startfleck schon nach 6 Tagen (Abb. 12).

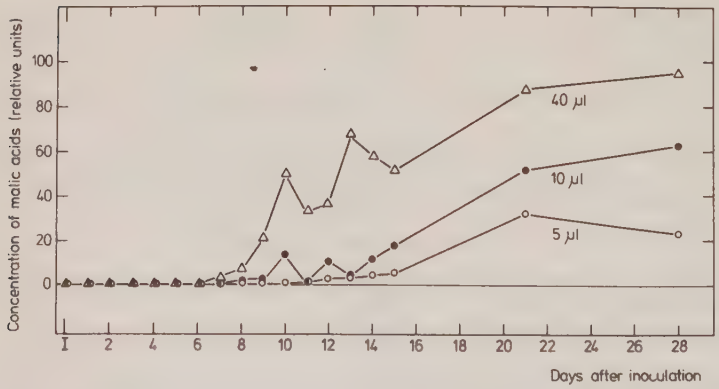

Abb. 12: Entwicklung des Äpfelsäuregehalts in Tumorgewebe, 0-28 Tage nach Inokulation mit Agrobacterium tumefaciens. Die Äpfelsäuremengen sind aufgetragen in relativen Einheiten für verschiedene Extraktmengen je Startfleck (5 µl, 10 µl, und 40 µl). Der Äpfelsäuregehalt steigt bei 40 µl Extrakt je Startfleck ab dem 6. Tag nach Inokulation erheblich an und erreicht im voll ausgebildeten Tumorgewebe ein konstantes Niveau.

Durch Agrobacterium tumefaciens induzierte Tumore enthalten demnach im Gegensatz zu Normalgewebe erheblich höhere Mengen an Äpfelsäure. Ihr Gehalt steigt spätestens ab dem 6. Tag nach der Inokulation sprunghaft an und erreicht etwa am 2o. Tag im voll ausgebildeten Tumor ein über längere Zeit gleichbleibendes Niveau. In diesem Punkt unterscheiden sich Tumor- und Normalgewebe von Helianthus annuus ganz erheblich.

Blattgewebe von Bryophyllum daigremontianum (CAM-Pflanze) zeigt unter den gegebenen Versuchsbedingungen (Abschnitt 2.11) einen normalen diurnalen Säurerhythmus (Abb. 13). Untersucht man den Äpfelsäuregehalt von Tumorgewebe von Bryophyllum daigremontianum Blättern, so stellt man fest, daß der Tumor die Fähigkeit, Äpfelsäure im Tagesrhythmus auf- und abzubauen, weitgehend verloren hat. Dies geht deutlich aus Abb. 13 hervor. Interessant ist dabei, daß solide Tumore von Bryophyllum daigremontianum und solche von Helianthus annuus dem Betrag nach etwa gleich viel Äpfelsäure je mg Tumorgewebe enthalten. Das ist umso beachtlicher, da Normalgewebe von Helianthus annuus keine nachweisbaren Äpfelsäuremengen enthält (Tab. 7).

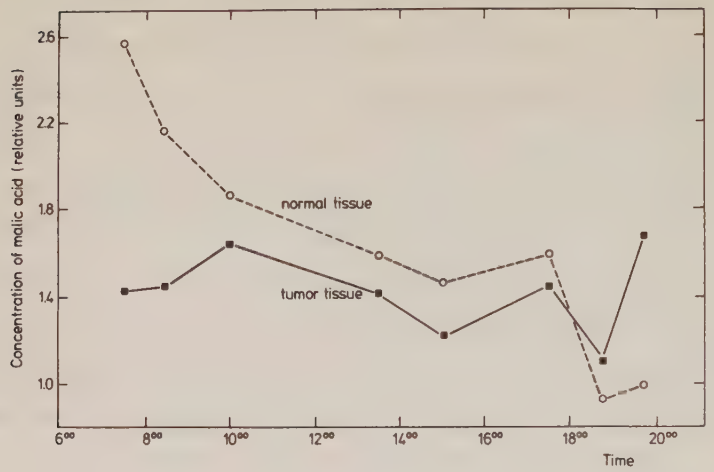

Abb. 13: Gehalt an Äpfelsäure (Relative Einheiten) in Normal- und Tumorgewebe von Bryophyllum daigremontianum. Angegeben sind die Änderungen im Laufe eines täglichen Lich - Dunkelwechsels (Licht: 6.oo bis 2o.oo Uhr, Tagtemperatur 25°C, Nachttemperatur 15°C). Nur Normalgewebe zeigt einen diurnalen Säurerhythmus.

Tab. 7: Relativer Gehalt an Äpfelsäure von Sonnenblumen- und Bryophyllumtumoren, bezogen auf einen Fleck aus 5 /ul einer o,5%igen Äpfelsäurelösung.

Sonnenblumentumor 4 Wochen alt	Bryophyllumtumor über 4 Wochen alt	Bryophyllum Normalgewebe
63%	7,3o Uhr: 7o%	7,3o Uhr: bis 132%
	8,3o Uhr: 71%	
	1o,3o Uhr: 76%	
	13,3o Uhr: 62%	
	15,oo Uhr: 54%	
	17,3o Uhr: 69%	
	18,45 Uhr: 51%	18,45 Uhr: 49%
	19,45 Uhr: 8o%	

3.8 Einfluß von Beleuchtungsprogrammen

Um den Einfluß von Beleuchtungsprogrammen auf die Tumorbildung festzustellen, wurden den Pflanzen verschiedene Licht-Dunkelwechsel angeboten. Ausgangspunkt war die Beobachtung, daß im Dauerdunkel im Gegensatz zu Dauerlicht nur ein sehr geringer Impferfolg zu verzeichnen war (Tab. 8).

Tab. 8: Anzahl der induzierten Tumoren in Prozenten, 14 Tage nach Inokulation, bei abgeschnittenen Blättern von Bryophyllum daigremontianum. LD: Licht-Dunkelwechsel (14 Stunden Licht je Tag), DD: Dauerdunkel, I: Zeitpunkt der Inokulation.

Programm:	Ergebnisse von: Vers. 1	Vers. 2
LD	64 ± 19	81 ± 9
DD	5 ± 4	17 ± 7
24 h DD vor I, dann LD	4o ± 12	32 ± 14
DD 24 h vor bis 24 h nach I, LD	4o ± 1o	35 ± 15
DD 24 h vor bis 48 h nach I, LD	51 ± 1o	49 ± 19
DD 24 h vor bis 72 h nach I, LD	41 ± 1o	25 ± 18
DD 24 h vor bis 96 h nach I, LD	---	28 ± 17

Die Dunkelzeiten wurden deshalb hier schrittweise um 24 Stunden, beginnend vom Einsetzen der abgeschnittenen Blätter in die Vogeltränken 24 Stunden vor der Inokulation, bis 96 Stunden nach der Inokulation, also bis zu 12o Stunden DD, verlängert. Im Dauerdunkel ist der Impferfolg wesentlich gegenüber einem normalen Licht-Dunkel-Wechsel

eingeschränkt. Aber auch schon 24 bis 12o Stunden Dunkelheit vor und nach der Inokulation genügen, um die Anzahl der Tumoren drastisch zu senken. Eine besonders empfindliche Zeit läßt sich mit diesem Versuch noch nicht erkennen. In weiteren Versuchen wurde verschieden lang vor und nach der Inokulation ein Licht-Dunkelwechsel mit nachfolgender Dauerdunkelzeit gegeben, und parallel dazu eine Versuchsreihe wie in Tab. 8 durchgeführt.

Tab. 9: Anzahl der induzierten Tumoren in Prozenten, 14 Tage nach Inokulation, bei abgeschnittenen Blättern von Bryophyllum daigremontianum. LD: Licht-Dunkelwechsel (14 Stunden Licht je Tag), DD: Dauerdunkel, I: Zeitpunkt der Inokulation.

Programm:	Ergebnisse:
LD	37
DD	5
24 h LD vor I, dann DD	14
LD 24 h vor bis 24 h nach I, DD	17
LD 24 h vor bis 48 h nach I, DD	22
LD 24 h vor bis 72 h nach I, DD	18
24 h DD vor I, dann LD	25
DD 24 h vor bis 24 h nach I, LD	9
DD 24 h vor bis 48 h nach I, LD	15
DD 24 h vor bis 72 h nach I, LD	14

Im Vergleich zu den Ergebnissen von Tab. 8 zeigt sich, daß trotz des hier geringen Impferfolges im Lich-Dunkelwechsel (37%) die Anzahl der Tumoren mit zunehmender Dauer der Lichtphase zunimmt, mit zunehmender Dunkelphase aber abnimmt (Tab. 8 und 9).

Um Auskunft über den Zeitpunkt der licht- bzw. dunkelempfindlichen Phase vor und nach der Inokulation zu erhalten, wurde der Licht-Dunkelwechsel (14 Stunden Licht je Tag) durch eine Dauerdunkelzeit von 72 Stunden unterbrochen. Die Anzahl der sich entwickelnden sichtbaren Tumoren auf den Bryophyllum-Blättern wurde jeden Tag gezählt. Die genaue Versuchsdurchführung und die Ergebnisse sind in Abb. 14 und Tab. 1o dargestellt.

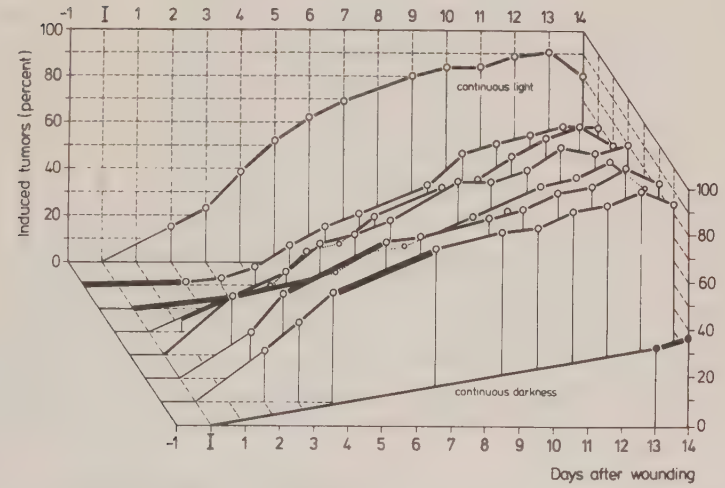

Abb. 14: Entwicklung der Anzahl der induzierten Tumoren in Prozenten im Licht-Dunkelwechsel (14 Stunden Licht je Tag) (continuous light), im Dauerdunkel (continuous darkness), und nach Einschub einer Dunkelzeit von 72 Stunden vor und nach der Inokulation (I) mit Agrobacterium tumefaciens. Dicke schwarze Balken bedeuten Dauerdunkel, Striche bedeuten Licht-Dunkelwechsel.

Tab. 1o: Anzahl der induzierten Tumoren in Prozenten, 14 Tage nach Inokulation, bei abgeschnittenen Blättern von Bryophyllum daigremontianum. LD: Licht-Dunkelwechsel (14 Stunden Licht je Tag), DD: Dauerdunkel, I: Zeitpunkt der Inokulation. Versuch 2 ist auch in Abb. 14 dargestellt.

Programm	Ergebnisse Versuch 1	Versuch 2
LD	95	81
DD	2	38
DD von 24 h vor bis 48 h nach I, LD	88	68
LD, DD von I bis 72 h nach I, LD	92	7o
LD, DD von 24 h bis 96 h nach I, LD	95	81
LD, DD von 48 h bis 12o h nach I, LD	96	71
LD, DD von 72 h bis 144 h nach I, LD	97	84
LD, DD von 96 h bis 168 h nach I, LD	93	85

Tab. 11: Anzahl der induzierten Tumoren in Prozenten, 14 Tage nach Inokulation, bei abgeschnittenen Blättern von Bryophyllum daigremontianum. LD: Licht-Dunkelwechsel (14 Stunden Licht je Tag), DD: Dauerdunkel, I: Zeitpunkt der Inokulation.

Programm	Ergebnisse von Versuch Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3
LD	41	81	88
DD	22	38	21
LD von 24 h vor bis 24 h nach I, DD	22	64	46
DD, LD von I bis 48 h nach I, DD	13	36	26
DD, LD von 24 h bis 72 h nach I, DD	16	55	22
DD, LD von 48 h bis 96 h nach I, DD	8	55	47
DD, LD von 72 h bis 12o h nach I, DD	17	6o	45
DD, LD von 96 h bis 144 h nach I, DD	22	65	32
DD, LD von 12o h bis 168 h nach I, DD	--	--	43

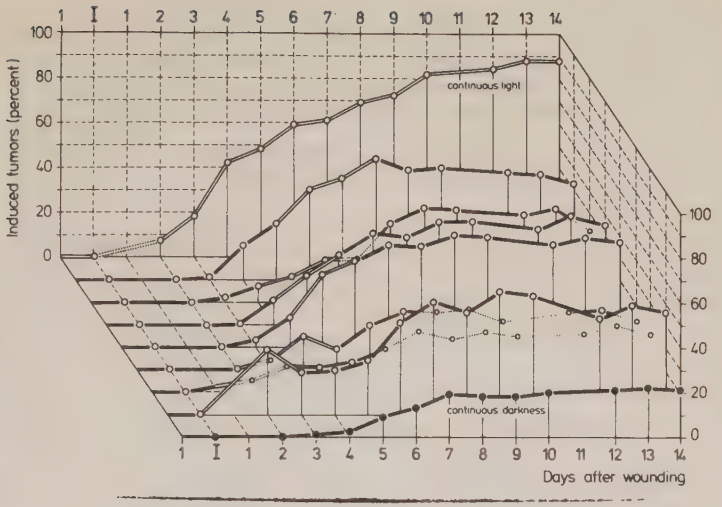

Abb. 15: Entwicklung der Anzahl induzierter Tumoren in Prozenten im Dauerdunkel (continuous darkness), im Dauerlicht (continuous light), und nach Einschub eines Licht-Dunkelwechsels (14 Stunden Licht je Tag) von 72 Stunden um und nach dem Zeitpunkt der Inokulation (I) mit Agrobacterium tumefaciens. Licht-Dunkelwechsel: Doppellinie, Dauerdunkel: Einfachlinie.

Der für Dunkelheit empfindlichste Zeitraum liegt offensichtlich zwischen dem Abschneiden der Blätter und einem Tag nach der Inokulation mit Agrobacterium tumefaciens.
Um noch zu bestimmen, wann Licht die Anzahl der Tumoren am meisten fördert, wurde während einer Dauerdunkelzeit zu verschiedenen Zeiten nach der Inokulation mit Agrobacterium

tumefaciens jeweils für 72 Stunden ein Licht-Dunkelwechsel gegeben (Abb. 15 und Tab. 11). Die Ergebnisse zeigen, daß die Lichtgabe im Vergleich zur Dauerdunkelkontrolle die Anzahl der induzierten Tumoren deutlich erhöht. Die geringste Förderung ergibt sich direkt nach der Inokulation (o bis 96 h nach I).

Durch Abdecken der Impfstelle an der Sproßachse mit Aluminiumfolie, bzw. durch die alleinige Verdunkelung der Blätter sollte der Ort der Lichtperzeption bzw. die Frage des Transports einer hypothetischen Substanz der Lichtperzeption zum Ort der Tumorinduktion geklärt werden. Bei den Dauerlichtkontrollen (siehe Abschnitt 2.12) waren an fast allen geimpften Verletzungen der Sproßachse Tumore gewachsen. Bei 5 Pflanzen zeigten sich zudem viele Wurzeln um die Impfstelle, bei weiteren 5 Pflanzen viele und bei 2 nur wenige Wurzeln. Bei den Dunkelkontrollen hatten 5 von 12 Pflanzen Tumore angesetzt, die fast so groß waren wie die der Lichtkontrollen. Bei 5 weiteren Pflanzen hatten sich erheblich kleinere Tumore gebildet. Bei den Versuchspflanzen, an denen nur die Impfstelle nicht verdunkelt war, war der Impferfolg fast so gut wie bei den Lichtkontrollen, und viel besser als bei den Dunkelkontrollen. In nur 2 Fällen hatten sich Wurzeln um die Impfstelle gebildet.

Bei der Versuchsgruppe, bei der nur die Sproßachse mit der Impfstelle verdunkelt war, ist in 8 Fällen ein guter Impferfolg zusammen mit einer starken Wurzelbildung festzustellen, in 4 Fällen waren die Tumore aber erheblich kleiner.

Bei der Inokulation von Bryophyllumstämmen genügt es also, wenn zur Erzielung eines optimalen Impferfolges nur die Umgebung des Tumores oder nur die Blätter belichtet werden. Das hypothetische Lichtperzeptionsprodukt wäre also transportierbar.

Da bei den oben beschriebenen Ergebnissen Indolylessigsäure beteiligt sein kann, wurde IES in Alkohol gelöst, in Paraffinöl eingerührt und auf die Unterseite von abgeschnittenen Bryophyllumblättern gestrichen. Der Versuch fand im Dauerdunkel statt. Nach einem Tag wurde wie üblich geimpft (Stamm B6). Durch 1 bis 10^{-5} mmol l^{-1} IES in Paraffinöl konnte auf diese Weise keinerlei Effekt auf die Anzahl der induzierten Tumoren festgestellt werden. Versuche mit Gibberellinsäure (1 bis 10^{-6} mmol l^{-1}) verliefen ebenso. Durch ringförmiges Auftragen von Trijodobenzoesäure (TIBA) um die Sproßachse zwischen den Blättern und der Impfstelle am Sproß wurde lediglich die Anzahl der Adventivwurzeln um die Tumore deutlich vermindert (TIBA in Vaseline, 10 bis 10^{-3} mmol l^{-1}).

Daß die ausreichende Bereitstellung von Stoffwechselprodukten bei der Induktion von Tumoren eine wichtige Rolle spielt, zeigt sich aus den Versuchen, bei denen im Dauerdunkel zusätzlich Glucose (20 g l^{-1}) angeboten wurde (Tab. 12). Zusätzliche Gaben von Glucose steigern eindeutig die Anzahl der induzierten Tumoren im Dauerdunkel. Die Verminderung des Impferfolges durch Glucose im Dauerlicht könnte ein osmotischer Effekt sein. Dieser Versuch wurde mit gleichem

Ergebnis mit Helianthus Keimlingen, verschiedenen Zuckerarten (Glucose, Fructose, Saccharose) und Bakterienstämmen wiederholt (Tab. 13). Dazu wurden die Keimlinge 8 Tage in Erde angezogen, und so abgeschnitten, daß die ältesten Seitenwurzeln noch an der Pflanze waren. Die Zuckerlösung (2o g l^{-1}) wurde alle 2 Tage erneuert. Zusätzliche Gaben von Glucose und Saccharose erhöhen den Impferfolg im Dauerdunkel ganz erheblich, während Fructose nicht ganz so wirksam ist. Versuche, bei denen die Speichercotyledonen der Helianthus Keimlinge vor der Inokulation abgetrennt wurden, bestätigen diese Ergebnisse. Sowohl im Licht-Dunkelwechsel als auch im Dauerdunkel werden mit nur einem bzw. keinem Keimblatt erheblich weniger Tumoren gebildet als mit 2 Keimblättern. Die ausreichende Nährstoffversorgung ist damit sowohl für die Pflanze als auch für die Induktion und das Wachstum von Crown gall Tumoren von entscheidender Bedeutung.

Tab. 12: Beeinflussung der Anzahl durch Agrobacterium tumefaciens induzierter Tumoren in Prozenten, bei abgeschnittenen Blättern von Bryophyllum daigremontianum durch Glucose (2o g l^{-1}) im Dauerlicht und im Dauerdunkel

	Dauerlicht	Dauerdunkel
Wasserkontrolle	86 ± 5	1o ± 1o
plus Glucose	7o ± 9	33 ± 12

Tab. 15: Beeinflussung der Anzahl durch Agrobacterium tumefaciens induzierter Tumoren in Prozenten bei Hypocotylen von Helianthus annuus durch verschiedene, über den Transpirationsstrom angebotene, Zucker (2o g l^{-1}). Die Versuche wurden mit Ausnahme der Pflanzen-in-der-Erde-Kontrolle im Dauerdunkel durchgeführt.

	nach 7 Tagen	nach 8 Tagen
Wasserkontrolle	1o	1o
plus Glucose	48	67
plus Fructose	29	38
plus Saccharose	48	52
Kontrolle in Erde	8o	87

4 Diskussion und Zusammenfassung

Die histologischen Untersuchungen wurden vorgenommen, um histologische und cytologische Daten für die Früherkennung und Entwicklung von Crown gall Tumorgewebe zu erhalten. Dabei fiel auf, daß sich im jungen Tumorgewebe aufgeblähte Kerne entwickeln, die in normalem und unverletzten, sowie in nur verletztem Gewebe nicht zu finden sind. Auch THERMAN (1956) beschrieb in 48 Stunden alten Crown gall Wunden von Vicia faba solche vergrößerte Kerne, die nach Feulgen besonders gut anzufärben waren. Dies wurde nach KUPILA (1958) an Erbsen bei 24 Stunden altem Crown gall Gewebe bestätigt. RASCH et al. (1959) führten an Vicia faba ausgedehnte Untersuchungen über den zeitlichen Verlauf dieser Kerngrößenänderungen durch, zusammen mit der Bestimmung des Ploidiegrades. Diese Färbeversuche sind deshalb von Bedeutung, weil KUPILA and THERMAN (1968) beschreiben, daß die Größe des Zellkernes nicht nur durch den Ploidiegrad des Kernes, sondern auch durch andere Faktoren beeinflußt werden kann. Die Untersuchungen von RASCH et al. (1959) und die hier vorgelegten Ergebnisse stimmen in den Punkten überein, daß wenige Tage nach der Inokulation das Volumen der Zellkerne stark zunimmt. Bei RASCH et al. (1959) steigt das Volumen nach 2 Tagen auf das Doppelte, bei den hier vorgelegten Daten auf ca. 25o% des Ursprungswertes. RASCH et al (1959) fanden jedoch auch in verwundetem Gewebe einen Anstieg des Kernvolumens auf ca. 17o% nach 2 Tagen. Eine derartige Zunahme war bei den hier durchgeführten Versuchen nicht zu

beobachten. Hier sank das Kernvolumen im Kallusgewebe im Verlaufe von 2 Wochen auf 2o - 3o% gegenüber Normalgewebe. 2C und 4C-Kerne erreichten bei RASCH et al (1959) nach 5 Wochen wieder das Ausgangsvolumen, oder lagen dicht darunter. In der Kernklasse "all nuclei" pendelten sie sich sogar bei 14o% ein. Dagegen fiel bei den vorliegenden Ergebnissen das Kernvolumen nach einem Monat auf ca. 3o%, und damit auf das Volumen der Epidermis und der Wundkalluszellen nach 14 Tagen. Bei Bryophyllum daigremontianum läßt sich also ein Tumor im Anfangsstadium mit Sicherheit an Hand des Kernvolumens identifizieren, während dies bei Vicia faba nicht möglich ist. Allerdings müssen hier noch weitere Unterschiede zwischen sehr jungem Tumorgewebe und Wundkallusgewebe diskutiert werden. Die Zellen des Tumors entwickeln sich in der Regel innerhalb der Zellschichten, die sich direkt an das, im frühen Stadium noch nicht identifizierbare, Wundkallusgewebe anschließen. Ferner liegen im Wundkallus die Zellwände streng parallel zur Wundfläche, während die Zellwände in Tumorzellen unregelmäßig in allen Ebenen eingezogen werden.

Über den Polidiegrad der Tumorzellkerne kann leider wenig ausgesagt werden, da die Feulgenfärbung lediglich zu einer besseren Anfärbung der Tumorkerne im Vergleich zu denen in Normalgewebe führte. RASCH et al. (1959) fanden in alten Tumoren sehr unterschielich große Kerne verschiedener Ploidiegrade: 2C bis 64C nach 33 Tagen. In Bryophyllum daigremontianum Gewebe gibt es nach den vorliegenden Untersuchungen

zur gleichen Zeit praktisch nur gleich große Zellen mit gleichgroßen Kernen (Abb. 3). THERMAN (1956), KUPILA (1958) und RASCH et al. (1959) geben an, daß das Cytoplasma in den Zellen um die Wunde deutlich sichtbar wird, und daß Kern- und Cytoplasma-RNA, sowie Proteingehalt, nicht aber Kernhistone zunehmen.NILES and MOUNT (1973) berichten, daß in Chromatin von Crown gall Zellen 5 mal mehr RNA produziert wird, als in gesunden Zellen. Auch YASUZUMI and SHIRAI (1975) beobachten in praecancerösen Zellen große Kerne und hohe Proteinsyntheseaktivität. LIPETZ (197o) und LIPEK (1968) fanden in Tumorzellen 1o mal mehr endoplasmatisches Reticulum. RASCH et al. (1959) bestimmten den RNA-Gehalt des Cytoplasmas und stellten fest, daß 5 Tage nach der Verwundung und Inokulation die cytoplasmatische RNA-Konzentration mit den 6 fachen des Normalwertes ein Maximum erreicht, um dann innerhalb von wenigen Tagen auf das 3 fache abzusinken. Entsprechende Vorgänge wurden auch bei der vorliegenden Arbeit festgestellt: etwa zu der Zeit, zu der das Kernvolumen am größten ist (2,5 fache des Normalwertes am 3. und 4. Tag nach Inokulation), erreicht der 2':3'cAMP-Spiegel, der durch mRNA-Abbau entsteht, sein Maximum ebenso (6 fache des Normalwertes am 3. Tag nach Inokulation), wie eine cAMP-PDE-Aktivität, die möglicherweise dieses 2':3' cAMP weiter abbaut (2,5 fache des Normalwertes am 5. Tag nach Inokulation). Wird die Pflanze nur verletzt, so liegen die Werte sowohl nach der vorliegenden Arbeit als auch nach RASCH et al. (1959) während der oben angegebenen Zeiten in der Regel

niedriger. Damit ist nicht auszuschließen, aber auch noch nicht bewiesen, daß das große Kernvolumen mit der erhöhten RNA-Synthese in Verbindung steht. Zwar sinkt das Kernvolumen nach einer Woche unter das Ausgangsvolumen, der Quotient Kern- zu Zellvolumen bleibt jedoch über dem Quotienten des Normalgewebes. ALVAREZ (1969) schreibt, daß bei Orchideenembryonen eine lineare Korrelation zwischen dem Logarithmus der DNA-Menge und dem Logarithmus des Kernvolumens besteht. Dies wird von BROEKKAERT and PARIJS (1973) bezweifelt. Sie beschreiben bei Crown Gall Gewebe von Erbsen weder eine Volumenzunahme noch eine C-Wert Zunahme. RASCH et al. (1959) jedoch geben für 2C- und 4C-Kerne eine vorübergehende Volumenzunahme in Pflanzentumoren am 2. Tag nach der Inokulation an. Vermutlich dürfte aber diese Volumenzunahme ein Zeichen für ihre erhöhte Mitoseaktivität sein. RASCH et al. (1959) finden in der Tat für diesen Zeitraum einen erhöhten "mitotic index" für Vicia faba, wobei die C-Werte der Kerne erst später allmählich zunehmen. Dies stimmt mit den Angaben von PARIJS (1973) überein. Bei Bryophyllum daigremontianum Tumoren nimmt das Kernvolumen nach dem 3. Tag wieder stark ab, und sinkt unter das Normalniveau der Normalzellen, ebenso wie der "mitotic index" nach RASCH et al. (1959). Auch dies spricht für eine Kernvolumenzunahme durch erhöhte Mitoseaktivität. RASCH et al. (1959) berichten außerdem von einer starken Volumenzunahme des Nucleolus, sowohl bei Tumor- als auch bei verwundetem Gewebe. Dies ist im Zusammenhang mit einer durch IES bzw. 2,4 D induzierten mRNA-Synthese im Nucleolus zu sehen (GRIERSON, pers. Mitteilung).

Eine Förderung der Anzahl der induzierten Tumoren durch zusätzliche Gaben von 2,4 D konnte nicht beobachtet werden, dagegen wirkt 10^{-1} mmol l^{-1} 2,4 D hemmend. Dabei konnte auch eine weitgehende Hemmung des Impferfolges mit zunehmender Dauer der 2,4 D Applikation beobachtet werden. Dies stimmt nicht unbedingt mit den Angaben von BAYER (1972) und BAYER and AHUJA (1968) an Nicotiana-Hybriden überein, deckt sich dagegen mit den Ergebnissen von AMES und Mitarbeitern (1969, 197o, 1974, 1975). Nach BAYER (1972) und BAYER and AHUJA (1968) wäre es naheliegend, daß auch bei Bryophyllum eine 2,4 D-Gabe vor der Inokulation den Impferfolg gegenüber der Kontrolle verbessern müßte. Da die von RASCH et al (1959) beobachtete Nucleolusvolumenzunahme auxininduziert ist, stimmen diese Daten mit der von BAYER (1972) und BAYER and AHUJA (1968) beobachteten Zunahme des Auxinspiegels nach einer Verletzung überein. Die Zunahme des Auxinspiegels ist jedoch keine Voraussetzung für eine Tumorinduktion, sondern die Folge allein der Verletzung. Nicht eine Hebung, sondern eine Senkung des Auxinspiegels fördert die Anzahl der induzierten Tumoren bei Bryophyllum daigremondianum.

Aus den Versuchen mit exogenen Gaben von Theophyllin und von Calcium-Ionen ergibt sich, daß möglicherweise das Eindringen des hypothetischen tumorinduzierenden Prinzips (TIP) dadurch beeinflußt wird, denn 24 Stunden nach der Inokulation hat Theophyllin keinen hemmenden Effekt mehr. Hier könnte man die Hypothese aufstellen, daß das TIP bei der Tumorinduktion von Membranvesikeln aufgenommen und in die

Zelle eingeschleußt wird, und daß dieser Vorgang ohne ausreichende Mengen an Ca^{2+} in der Membran nicht möglich ist (POSTE and ALLISON, 1973). Dieser Vorgang der Endocytose wäre empfindlich auf Theophyllin (PAUL and GOFF, 1973). Falls diese Hypothese richtig wäre, könnte das TIP ein größeres Molekül sein, denn kleine Moleküle gelangen auf anderem Wege in die Zelle.

Bei der Betrachtung der Äpfelsäurebestimmungen während der Entwicklung von Crown gall Tumorgewebe bei Helianthus annuus muß beachtet werden, daß die Proben, die in den ersten Tagen nach der Inokulation entnommen wurden, bedingt durch die Kleinheit des induzierten Tumorgewebes zu dieser Zeit und der Präparationsmethode, sehr viel gesundes Gewebe enthalten. Es darf deshalb angenommen werden, daß sich der Malatspiegel im Tumorgewebe schon sehr viel früher erhöht als das gemessen werden kann (Abb. 12). Es ist in erster Linie eine Frage der aufgetragenen Extraktmenge, ob Malatspuren auf dem Chromatogramm nachgewiesen werden können oder nicht. Dies bedeutet, daß im Tumorgewebe möglicherweise schon sehr früh ein erhöhter Malatspiegel zu finden ist, der nach HASCHKE und LÜTTGE (1977) durch einen erhöhten IES-Spiegel verursacht sein kann.

Tumorgewebe von Bryophyllum daigremontianum hat offenbar die Fähigkeit tagesperiodisch Äpfelsäure in einem diurnalen Säurecyclus (CAM) auf- und abzubauen verloren (Abb. 13). Die Menge an Äpfelsäure schwankt um die Werte für Normalgewebe von Bryophyllum am späten Nachmittag. Dabei enthält

Tumorgewebe von Bryophyllum daigremontianum und Helianthus annuus gleich viel Äpfelsäure. Erstaunlich ist dabei, daß die erhöhte Äpfelsäuremenge bei Tumorzellen an Hypocotylen von Helianthus annuus ab dem 6. Tag nach der Inokulation sprunghaft ansteigt und im voll ausgebildeten Tumorgewebe über längere Zeit ein konstantes Niveau beibehält. Tumor- und Normalgewebe unterscheiden sich in dieser Eigenschaft sehr deutlich: Helianthus annuus hat normalerweise keine chromatographisch nachweisbaren Malatmengen, und bei Bryophyllum daigremontianum Blättern schwanken sie tagesperiodisch. Da die Äpfelsäurebildung über den pH-Wert von dem IES-Spiegel abhängig sein kann, muß jener sich parallel zur Äpfelsäuremenge entwickeln. Offensichtlich steigt der IES-Spiegel im Tumorgewebe kurz nach der Inokulation an und erreicht nach ca. 3 Wochen ein konstantes Niveau.

Wie die Versuche mit verschiedenen Beleuchtungsprogrammen zeigen, liegt der empfindlichste Zeitraum für eine eingeschobene Licht- bzw. Dunkelphase kurz vor bzw. kurz nach der Inokulation. Es ist kaum anzunehmen, daß eine relativ kurze Dunkelphase durch direkte Beeinflussung des Stoffwechsels der Wirtspflanze den Impferfolg nachhaltig vermindern kann. Es liegt die Vermutung nahe, daß hier 2 unterschiedliche Lichtreaktionen beteiligt sein können. Für diese Annahme spricht, daß 1 bis 4 Tage Dunkelheit vor und nach der Inokulation, mit anschließendem Dauerlicht etwa die gleiche Verminderung des Impferfolges ergeben,

wie Licht während dieses Zeitraumes, bei anschließend Dunkelheit bis zur Auswertung. 72-stündige Lichtphasen nach der Inokulation und später ergeben ein Minimum des Impferfolges und damit der Lichtwirksamkeit zwischen der Inokulation (I) und 72 Stunden danach, statt des erwarteten Maximums (Abb. 16).

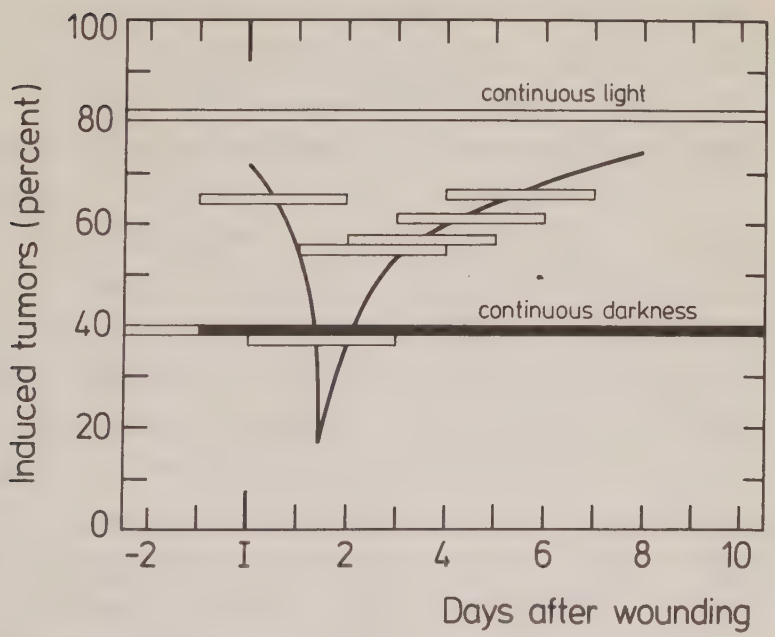

Abb. 16: Anzahl der induzierten Tumoren in Prozenten auf Blättern von Bryophyllum daigremontianum im Dauerlicht (continuous light), im Dauerdunkel (continuous darkness) und nach Unterbrechung des Dauerdunkels durch 72-stündige Lichtgaben (weiße Balken) zu verschiedenen Zeiten vor und nach der Inokulation mit Agrobacterium tumefaciens. Die geringste Förderung im Vergleich zum Dauerdunkel ergibt sich direkt nach der Inokulation.

Dies läßt sich nur so erklären, daß Licht nach dem 2. bzw. 3. Tag nach der Inokulation das Tumorwachstum durch bessere Versorgung des Gewebes fördert. Es ist allerdings völlig offe welcher Natur die für die Tumorinduktion wichtige(n) Lichtreaktion(en) und welche(s) Photosystem(e) oder welcher Photorezeptor(en) dafür verantwortlich ist (sind). Dazu müßten Wirkungsspektren aufgenommen werden, die im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgesehen waren.
Aus den Versuchen mit der partiellen Belichtung von Bryophyllum-Pflanzen ergibt sich, daß es für eine optimale Tumorinduktion ausreicht, wenn die direkte Umgebung des Tumors belichtet wird. Für einen guten Impferfolg genügt es auch nur die Blätter zu belichten, während die Impfstelle am Sproß im Dunkeln liegt. Dies bedeutet, daß ein an dieLichtreaktion gekoppeltes Produkt transportiert wird. Dies kann durch Zuckergaben über den Transpirationsstrom ersetzt werden. Dabei wird Glucose und Saccharose etwa gleich gut verwertet, Fructose wesentlich schlechter. Sowohl im Licht-Dunkelwechsel als auch im Dauerdunkel zeigte es sich, daß die Ernährung der Wirtspflanze und damit des Tumors durch die Keimblätter bei Keimlingen von Helianthus annuus von großer Bedeutung ist. Schneidet man diese ab, vermindert sich die Anzahl der durch Agrobacterium tumefacien am Hypocotyl induzierten Tumoren ganz erheblich.

Im folgenden soll der Versuch unternommen werden, aus den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen und den bereits erarbeiteten Daten aus der Literatur eine Synthese der Funk-

tionsabläufe der durch Agrobacterium tumefaciens hervorgerufenen Umwandlung von Normal- in Tumorzellen zusammenzustellen.

In der ersten Phase der Entwicklung von Tumorzellen lassen sich grundsätzlich zwei verschiedene Reaktionstypen unterscheiden:

A. Reaktionstypen, bei denen innerhalb der ersten Woche nach der Inokulation die Aktivität ansteigt, um dann wieder etwa auf den Normalwert oder darunter abzusinken. In der vorliegenden Arbeit wurde dies für das Kern- und Zellvolumen, für cyclisches Adenosinmonophosphat und für Phosphodiesterase beschrieben. Ebenso verhalten sich die Nucleolusgröße und RNA-Menge.

B. Reaktionstypen, bei denen innerhalb der ersten Tage nach der die Aktivität ansteigt, dann aber in der folgenden Entwicklung auf diesem erhöhten Wert bleibt. In der vorliegenden Arbeit wurde dies für die Äpfelsäuremenge gefunden. Dies gilt auch für Phytohormone, insbesondere für Indolylessigsäure.

Nach der Inokulation mit Agrobacterium tumefaciens lassen sich außerdem zwei Stadien der Tumorentwicklung beschreiben, die unterschiedlich auf Licht und chemische Stoffe, z.B. Theophyllin, reagieren:

Die Induktionsphase, also die erste Umstimmung der Normalzelle zur Tumorzelle. In dieser Phase wird durch Dunkelheit oder Theophyllin die Anzahl der induzierten Tumoren stark gemindert.

Die Wachstums- und Teilungsphase, nachdem eine oder mehrere Normalzellen zu Tumorzellen transformiert wurden. Hier übt Theophyllin keinen entscheidenden Einfluß mehr aus, und die für die Tumorentwicklung notwendige Beleuchtung kann durch Glucosegaben über den Transpirationsstrom ersetzt werden. Im Folgenden soll die Induktion, die Transformation und das Wachstum von Crown gall Tumorzellen nach allen bisher bekannten Ergebnissen in Einzelschritte zerlegt und möglichst genau beschrieben werden:

1. Die Wirtspflanze wird verletzt. Dadurch verändert sich der Phytohormonspiegel.

2. An die verletzte Stelle der Pflanze wird Agrobacterium tumefaciens gebracht (Inokulation), die sich in den Interzellularräumen im Bereich der Verletzung ausbreiten.

3. Die Bakterien vermehren sich in der Wunde und treten mit konditionierten, aber unverletzten Zellen in Kontakt.

4. Die Bakterien heften sich an der Oberfläche der Zellwand dieser Zellen an. In diesem Stadium kann die Anheftung durch avirulente Agrobacterien oder mit Aktivkohle verindert werden (SCHROTH and MOLLER, 1976; DHANVANTRAI, 1976; NEW and KERR, 1972;, BEIDERBECK, 1976).

5. Das Hypothetische tumorinduzierende Prinzip (TIP) durchdringt die Zellwand.

6. Das TIP wird über Vesikelbildung des Plasmalemmas aufgenommen und in die Zelle eingeschleust. Dabei kann Theophyllin und Ca^{2+}-Mangel stören.

7. Das TIP veranlaßt die Zelle zu einer dauernden Produktion von Phytohormonen, insbesondere von Indolylessigsäure (Auxinautotrophie).

8. Die erhöhte IES-Produktion bewirkt in den Nucleoli eine erhöhte mRNA-Synthese, wodurch sich die Nucleoli und auch der Kern erheblich vergrößern (Riesenkernbildung). Dabei spielt eine Endoploidisierung noch keine Rolle.

9. Die mRNA wird nach einer gesteigerten Proteinsynthese wieder abgebaut. Dabei spielen möglicherweise die gemessenen erhöhten Mengen an cyclischem Adenosinmonophosphat und Phosphodiesterase eine Rolle. Nach 7 Tagen ist dieser Vorgang abgeschlossen, da die genannten Aktivitäten wieder das Niveau von Normalzellen erreichen.

1o. Die Auxinautotrophie der Tumorzellen führt anfänglich zu einer Zellstreckung bzw. Zellvolumenvergrößerung, die bereits 3 Tage nach der Inokulation beobachtet werden kann, dann aber eine erhöhte Zellteilungsaktivität. Gleichzeitig werden auf Dauer erhöhte Äpfelsäuremengen bereitgestellt, die Protonen für die Zellwandstreckung liefern sollen. In diesem Zustand ist die Transformation abgeschlossen und eine Transplantation des Tumors ist möglich. Er wächst dann auch ohne zusätzliche Phytohormone auf Minimalmedium weiter.

5. Literaturverzeichnis

AAron-da Cunha, M.J.
Recherches sur la permanence et la transmission des propriété tumorales des celles de Crown gall
Ann. Sci.Nat., Botan., 12^{e} Sér. 11 33-4o8 197o

Alvarez, M.R.
Cytophotometric study of nuclear proteins and nucleic acids in parenchymatous tissues of the Orchid embryo.
Experimental Cell Research 57 179-184 1969

Ames, I.H.
Induction of tumor formation in Nicotiana amphiploids with Trijodobenzoic acid.
Canad. J. Bot. 48; 22o9-2212; (197o)

Ames, I.H.
Endogenous levels of Auxin and tumorigenesis in a Nicotiana amphiploid
Plant Physiol. 54(6) 953-955 1974

Ames, I.H.
The possible role of cyclic AMP in the control of genetic tumor induction
Plant Cell Physiol. 17 1o59-1o66 1976

Ames, I.H., Mistretta, P.W.
Auxin: Its role in genetic tumor induction
Plant Physiol. 56(6) 744-746 1975

Ames, I.H., Rice, T.B., Smith, H.H.
Inhibition of Tumor induction by Auxin in total debudded Nicotiana glauca x langsdorfii
Plant Physiol. 44 3o5-3o7 1969

Amrhein, N.
Evidence against the occurence of adenosine-3':5'-cyclic monophosphate in higher plants
Planta 118(3) 241-258 1974

Amrhein, N.
Cyclic nucleotide phosphodiesterase in plants
Z. Pflanzenphysiol. 72(3) 249-261 1974

Anderson, W.B., Russel, T.R., Carchman, R.A., Pastan, I
Interrelationship between adenylate cyclase activity, cyclic-AMP-phosphodiesterase, ciclicAMP-levels and growth of cells in culture.
Proc. Nat. Acad. Sci. (wash) 7o 38o2-38o5 1973

Ark, P.A., Hunt, M.L.
Plant intumescences induced by Enterobacteriaceae of human origin
Phytopathology 56 145 1965

Avanzi, S., Maggini, F., Innocenti, A.
Amplification of ribisomal cistrons during the maturation of metaxylem in the root of Allium cepa
Protoplasma 76 197-21o 1973

Babula, M.J., Galsky, A.G.
Effects of cyclic-AMP on the formation of Crown gall tumors on the primary leaves of Phaseolus vulgaris, var pinto
Plant Cell Physiol. 16 357-36o 1975

Bastos, A.L., Marques, D.
Nile blue inductible fluorescence of tumor cells
Z. Naturforsch. 27b 1395-1398 1972

Bayer, M.H.
Transport and accumulation of IAA-^{14}C in tumor forming Nicotiana hybrids
J. of Exp. Bot. 23,76 8o1-812 1972

Bayer, M.H., Ahuja, M.R.
Tumor formation in Nicotiana: Auxinlevels and Auxin inhibitors in normal and tumor prone genotyps
Planta 79 292-298 1968

Beardsley, R.E.
The inception phase in Crown gall disease
In: Braun, A.C. (ed): Progr. Exp. Tumor Res. 15
1-75 Basel, S. Karger, 1972

Beaud, R., Beardsley, R.E., Kurkdijan, A.
Bacteriophages of Agrobacterium tumefaciens, III. Effect of attenuation of virulence on lysogeny and phage production
Can. J. Microbiol. 18 1561-1567 1972

Beiderbeck, R.
I. Quantitative Bestimmung des Infektionserfolges verschieden vorbehandelter Bakterien mit dem Igeltest
Z. Naturforsch. 25b 4o7-411 197o

Beiderbeck, R.
Induction von Tumoren und Produktion des Phagen PS8 durch Agrobacterium
Planta 1o5 181-184 1972

Beiderbeck, R.
Amanitin hemmt die Tumorinduktion durch Agrobacterium tumefaciens
Z. Naturforsch. 27b 1393-1394 1972

Beiderbeck, R. Heberlein, G.T., Lippincott, J.A.
On the question of Crown gall tumor initiation by DNA of bacteriophage PS8
J. Virol. 11 345-35o 1973

Beiderbeck, R.
Bakterienwand und Tumorinduktion durch Agrobacterium tumefaciens
Z. Naturforsch. 28 198-2o1 1973

Beiderbeck, R.
Contact of Agrobacterium with wound cells as a prerequisite of tumor induction
Z. Naturforsch. Sect. C. Biosci. 31(5/6) 317-317 1976

Bendich, A.J., McCarthy, B.J.
Ribosomal RNA homologies among distantly related organisms
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 65 349-356 197o

Biemann, K., Lioret, C., Asselnieau, J., Lederer, E., Polonsky, J.
On the structure of Lysopine, a new amino acid, isolated from Crown gall tissue
Biochim. Biophys. Acta 4o 369-37o 196o

Binna, A, Meins, F.
Habituation of tabaco pith cells for factors promoting cell division is heritable and potentially reversible
Proc. Nat Acad. Sci. U.S.A. 7o 266o-2662 1973

Bomhoff, G.H.
Studies on Crown gall - a plant tumor. Investigations on protein composition and on the use of Guanidine compounds as a marker for transformed cells.
Ph. D. thesis, Rijksuniversiteit, Leiden,
The Netherlands 1974

Bopp, M., Leppla, E.
Vergleich der Histogenese der Wurzelhalsgallen an Blättern und Sproßachsen von Kalanchoe daigremontianum
Planta 61 36 ff 1964

Bown, A., Dymock, I.
Antagonism between Malate and Ethylene in the regulation of Avena sativa coleoptile elongation
Plant Physiol. 57 Suppl. 99 1976

Braun, A.C.
Thermal studies on the factors responsible for tumor initiation in Crown gall
Am. J. Bot. 34 234-240 1947

Braun, A.C.
Bacterial and host factors concerned in determining tumor morphology in Crown gall
Bot. Gaz. (Chicago) 114 363-371 1953

Braun, C.C.
A physiological basis for autonomous growth of the Crown gall tumor cell
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 44 344-349 1958

Braun, A.C., White, P.R.
Bacterial sterility of tissues derived from secondary Crown gall tumors
Phytopathology 33 85-100 1943

Braun, A.C., Wood, H.N.
On the inhibition of tumor inception in the Crown gall disease with the use of ribonuclease
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 56 1417-1422 1966

Brennicke, A., Frey, H.D.
Properties of an adenosine cyclic phosphates degrading enzyme in Nicotiana tabacum L., var. xanthi
Z. Naturforsch. 32c 297-300 1977

Brennicke, A., Frey, H.D.
Cyclic-AMP Phosphodiesterase in Crown gall tumors caused by Agrobacterium tumefaciens.
In: Nucleotides Cycliques de Synthèse et Perspectives Therapeutiques, Paris 1978

Brewin, N.J. Northcote, D.H.
Variations in the amounts of 3'::5'-cyclic AMP in plant tissues
J. Exp. Bot. 24(82) 881-888 1973

Brewin, N.J., Northcote, D.H.
Partial purification of a cyclic AMP phosphodiesterase from Soybean callus
Biochim. Biophys. Acta 320(1) 104-122 1973

Broekaert, D.R., van Parijs
Histological observations and histophotometric DNA measurements in wound tissues of Pisum sativum L. infected with Agrobacterium tumefaciens
J. of Exp. Bot. 24(82) 820-827 1973

Brunner, M., Pootjes, C.A.
Bacteriophage release in a lysogenic strain of Agrobacterium tumefaciens
J. Virol. 3 181-186 1969

Carlson, P.S.
The use of protoplasts for genetic research
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70 598-602 1973

Catarino, F.M., Resede, F.
Kinetin like substances produces by plant tumors
Pot. acta Biol. 9 373-382 1966

Chadha, K.C., Srivastava, B.I.S.
Evidence for the presence of bacteria-specific proteins in sterile Crown gall tumor tissue
Plant Physiol. 48 125-129 1971

Chilton, M.-D., Farrand, S.K., Eden, F., Currier, T. Bendich, A.J., Gorden, M.P., Nester, E.W.
Is the foreign DNA in Crown gall tumor DNA?
2nd. Ann. Jon Innes Symp. Modification of the information content of plant cells, p. 253-268. R. Markham, D.R. Davies, Hopwood, D.A. and Horne, R.W. (eds.).
New York: American Elsevier 1975

Cline, M.G., Edgeston, M., Rehm, M.M.
Accelerated endogenous growth in Avena coleoptile segments
Planta 120 213-214 1974

Davies, F.S., Man, S.-L.C., Noodn, L.D.
Auxin synthesis in Crown gall tumor tissue: A comparisom of three putative precursors
Physiol. Plant. 33(1) 39-41 1975

DeTorok, D., Cornesky, R.A.
Antigenic and immunological determinants of oncogenesis in plants infected with Agrobacterium tumefaciens
p. 443-451. in: Les Cultures de Tissues de Plantes.
Coll. Int. C.N.R.S. (Paris) No. 193, Strasbourg 1971

DeVay, J.E., Romani, R.J., Modajem, A.M., Etzler, M.
Induction of phytorecipients in sunflower gall tissue in response to infection by Agrobacterium tumefaciens
Phytopathology 60 1289 1970

Dhanvantrai, B.N.
Biological control of Crown gall of peach in south - western Ontario
Plant dis. Rep. 60(7) 549-551 1976

Doy, C.H., Gresshoff, P.M., Rolfe, B.G.
Biological and molecular evidence for the transgenosis of genes from bacteria to plant cells
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70 723-726 1973

Drlica, K.A., Gardener, J.M., Kado, G.I., Vijay, I.K.
Troy, F.A.
Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate levels in normal and transformed cells of higher plants.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 56 753-759 1974

Drlica, K.A., Kado, C.I.
Quantitative estimation of Agrobacterium tumefaciens DNA in Crown gall tumor cells
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71 3677-3681 1974

Drlica, K.A., Kado, K.I.
Crown gall tumors: are bacterial nucleic acids involved?
Bacterial Rev. 39(3) 186-196 1975

Eden, F.C., Ferrand, S.K., Powell, J., Bendlich, A.J. Chilton, M.-D., Nester, E.W., Gordon, M.P.
Attempts to detect desoxiribonucleic acids from Agrobacterium tumefaciens and Bacteriophage PS8 in Crown gall tumors by complementary ribonucleic acids/ desoxiribonucleic acid filter hybridization
J. Bacteriol. 119 547-553 1974

Fox, E.
Growth factor requirements and chromosome number in Tabacco tissue cultures
Physiol. Plant. 16 793-803 1963

Frey, H.D., Kirchhoff, V., Brennicke, A.
The involvment of the 3':5'-cyclic-AMP phosphodi-esterase in transformation and growth of Crown gall tumors in Bryophyllum daigremontianum
Planta 137 165-168 1977

Galsky, A.G., Lippincott, J.A.
Promotion and inhibition of a-Amylase production in Barley endosperm by cyclic 3':5' adenosin monophosphate and Adenosin diphosphate
Plant Cell Physiol. 10 607-620 1969

Gautheret, R.J.
The nutrition of plant tissue cultures
Annu. Rev. Plant Physiol. 6 433-484 1955

Gerlach, D.
Botanische Mikrotechnik. Eine Einführung
Thieme-Verlag Stuttgart 1969

Gilbert, M.L., Galsky, A.G.
The action of cyclic AMP on GA, controlled responses III: Characteristics of barley endosperm acid phosphatase induction by Gibberellic acid and cyclic 3':5'-adenosine monophosphate.
Plant Cell Physiol. 13 867-873 1973

Le Goff, L., Manigault, P.
Effects de l'atténuation des bactéries sur l'expression du pouvier oncogéne d'Agrocbacterium tumefaciens
Compt. Rend. 275 381-384 1972

Goldmann, A., Tempé, J. Morel, G.
Quelques particularités de diverses souches d'Agrobacterium tumefaciens
C. R. Acad. Sci. 162 630-631 1968

Goldmann, A., Thomas, D., Morel, G.
Sur la structure de la nopaline metabolite abnormal de certaines tumeurs de crown gall
C. R. Acad. Sci. 268 852-854 1969

Gordon, S.A., Weber, R.P.
Colorimetric estimation of indol acetic acid
Plant Physiol. 26 192-195 1951

Hager, A., Menzel, H., Krauss, A.
Versuche und Hypothese zur Primärwirkung des Auxins beim Streckungswachstum.
Planta 1oo 47-75 1971

Haschke, H.P., Lüttge, U.
Interactions between IAA, Potassium, and Malate accumulation, and growth in Avena coleoptile segments
Z. Pflanzenphys. 76(5) 45o-455 1975

Haschke, H.P., Lüttge, U.
Stochiometric correlation of Malate accumulation with Auxin-dependent K^+-H^+ exchange and growth in Avena coleoptile segments.
Plant Physiol. 56 696-698 1975

Haschke, H.P., Lüttge, U.
Action of Auxin on CO_2 dark fixation in Avena coleoptile segments as related to elongation growth
Plant Sci. Letters 8 53-58 1977

Haschke, H.P., Lüttge, U.
Auxin action on K^+-H^+-exchange and growth $^{14}CO_2$-fixation and Malate accumulation in Avena coleoptile segments.
In: Regulation of Cell Membrane Activities in Plants
E. Marrè and O. Cifferi eds.
Elsvier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam 1977

Hatano, S.
Specific effect of Ca^{2+} on movement of plasmodial fragment obtained by caffeine treatment
Exp. Cell Res. 61 199-2o3 197o

Heberlein, G.
Enhacement of Agrobacterium tumefaciens infectivity by chlorpromazine hydrochloride
Infect. Immun. 2 468-473 197o

Heberlein, G., Lippincott, J.A.
Photoreversible ultraviolet enhacement of infectivity in Agrobacterium tumefaciens
J. Bacteriol. 89 1511-1514 1965

Heberlein, G. Lippincott, J.A.
Ultraviolet-induced changes in infectivity of Agrobacterium tumefaciens
J. Bacteriol. 93 1246-1253 1966

Heberlein, G. Lippincott, J.A.
Enhacement of Agrobacterium tumefaciens infectivity by mitomycin C
J. Bacteriol. 94 147o-1474 1967

Henderson, J.H.M., Bonner, J.
Auxin metabolism in normal and Crown gall tissue of sunflower
Am. J. Bot. 39 444-451 1952

Hirt, L.
Comparative properties of plant tumors
p. 427-453, in: Viruses, Evolution an Cancer, Academic Press Inc., San Francisco, 1974

Hildebrand, D.C., Thompson, J.P., Schroth M.N.
Bacterial enhacement of self-limiting outgrowth formation on Datura
Phytopathology 56 365-366 1966

Ingle, J., Sinclair, J.
Ribosomal RNA genes and plant development
Nature (London) 235 3o-32 1972

Johnson, C.B., Grierson, D.
The uptake and expression of DNA by plants
Curr. Adv. Plant Sci. 4 1-12 1974

Johnson, C.B., Grierson, D., Smith, H.
Expressin of lambda plac 5 DNA in cultured cells of a higher plant
Nature (London) New Biology 244 1o5-1o7 1973

Johnson,R., Guderian, R.J., Eden, F., Chilton, M.-D., Gordon, M.P., Nester, E.W.
Detection and quantitation of Octopine in normal plant tissue and in Crown gall tumors
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71 536-539 1974

Kado, C.I.
Studies on Agrobacterium tumefaciens III. A concept on the role of Agrobacterium tumefaciens DNA in plant tumorigenesis.
In: Proc. 1st Int. Cong. Microbiol. Soc., Tokyo
in press 1974

Kado, C.I., Lurquin, P.F.
Studies on Agrobacterium tumefaciens IV. Nonreplication of the bacterial DNA in mung bean (Phaseolus aureus)
Biochm. Biophys. Res. Commun. 64 175-183 1975

Kamisaka, S., Masuda, Y.
Stimulation of Gibberellin-induced germination in lettuce seeds by 3':5' adenosine monophosphate.
Plant Cell Physiol. 12 1003-1005 1971

Kamisaka, S., Sano, H., Katsumi, M., Masuda, Y.
Effects of cyclic AMP an Gibberellic acid on lettuce hypocotyl elongation and mechanical properties of its cell wall
Plant Cell Physiol. 13 167 1972

Kao, K.N., Constabel, F., Michayluk, M.R., Gambory, O.L.
Plant protoplasts fusion and growth of intergeneric hybrid cells
Planta 120 215-227 1974

Karsten, U.
Kininartige Wirkungen von Tumoren an Bryophyllum daigremontianum
Flora, Abt. A, 156 428-444 1966

Kerr, A., Htay, K.
Biological control of Crown gall through bacteriocin production
Physiol. Plant Pathol. 4 37-44 1974

Kersters, K., De Ley, J., Sneath, P.H.A., Sackin, M.
Numerical txonomic analysis of Agrobacterium
J. Gen. Microbiol. 78 227-239 1973

Kirchhoff, V.
Die Rolle von cyclischem 3':5' Adenosin-Monophosphat (cAMP) und Phosphodiesterase (PDE) bei der Induktion von Pflanzentumoren auf Bryophyllum daigremontianum durch Agrobacterium tumefaciens (Stamm B6k)
Zulassungsarbeit zur Wiss. Prüfung für das höhere Lehramt, Tübingen 1974

Klein, R.M., Braun, A.C.
On the presumed sterile induction of plant tumors
Science 131 1612 196o

Klein, R.M., Knupp, J.L.
Sterile induction of Crown-gall tumors on carrot tissues in vitro
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 43 199-3o2 1957

Kluge, M.
Die Sukkulenten: Spezialisten im CO_2-Gaswechsel
Biologie in unserer Zeit 4 12o-128 1972

Kull, U., Kuehn, B.
Influence of Zeatin and Gibberellin on Adenosine 3':5'-cyclic monophosphate levels of Impatiens leaves
Z. Naturforsch. Sekt. C Biosci. 3o(1) 69-72 1975

Kupila, S.
Anatomical and cytological comparisom of the development of Crown gall in three spezies
Ann. Botan. Soc. "Vannamo" 3o 1-89 1958

Kupila, S., Therman, E.
Morphogenesis of Crown gall
Advances in Morphogenesis 7 45-78 1968

Kurkdijan, A.
Apparition de phages au cours de l'induction des tumeurs de Crown gall
J. Microskopie 7 1o39-1o44

Kurkdijan, A., Beardsley, R., Manigault, P
Bactériophages d'Agrobacterium tumefaciens. II. Souche B6m lysogène dans les tissues de Pisum sativum L., et effet de la Glycine sur la production des Phages
Ann. Inst. Pasteur 114 555-565 1968

Leff, J., Beardsley, R.E.
Action tumoiéne de l'acide nucléique d'un bacteriophage présent dans les cultures de tissu tumoral de tounesol (helianthus annuus)
C.R. Acad. Sci. 27o 25o5-25o7 197o

Limaset, P., Gautheret, R.J.
Sur le caractêre tumoral des tissues de tabac ayant subi le phénomène d'accountumance aux hétéro-auxines
C.R. Acad. Sci. 23o 2o43-2o45 195o

Lin, P., Varner, J.E.
Cyclic nucleotide phosphodiesterase in pea seedlings
Biochim. Biophys. Acta 276 454-474 1972

Linser, H.
Versuche zur chromatographischen Trennung pflanzlicher Wuchsstoffe
Planta 39 377-4o1 1951

Linser, H., Mayr, H., Maschek, F.
Papierchromatographie von zellstreckend wirksamen Indolkörpern aus Brassica-Arten
Planta 44 1o3-12o 1954

Lioret, Ca.
Les acides aminés libres des tissues de Crown gall cultivés in vitro. Mise en évidence d'un acide aminé particulier à ces tissus
C.R. Acad. Sci. 275 137-139 1972

Lipetz, J.
Changes in the endoplasmatic reticulum of plant tumor cells
J. Cell Biol. 39 81A-82A 1968

Lipetz, J.
Fine structure studies of plant tumor cells
J. of Cell Biol. 35 82A 1967

Lipetz, J.
The fine structure of plant tumors: I : Comparison of Crown gall and hyperplasic cells
Protoplasma 7o 2o7-216 197o

Lippincott, J.D., Beiderbeck, R., Lippincott, B.B.
Utilization of Octopine and Nopaline by Agrobacterium
J. Bacteriol. 116 378-383 1973

Lippincott, B.B., Lippincott, J.A.
Bacterial attachment to a specific wound site as an essential stage in tumor initiation by Agrobacterium tu.
J. Bacteriol. 97 62o-628 1969

Lippincott, J.A., Lippincott, B.B.
Morphogenic determinants as exemplified by the Crown gall disease
In: Encyclopedia of Plant Physiology, new Series, Vol. Iv, Physiological Plant Pathology, pp 356-381 Heitefuss, R., Williams, P.H. eds., Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1976

Lippincott, J.A., Lippincott, B.B., Chang, C.C.
Promotion of Crown gall tumor growth by Lysopine, Octopine, Nopaline and Carnosine
Plant Physiol. 49 131-137 1972

Manigault, P, Beaud, G.
Expression de l'efficacité de la bactérie Agrobacterium tumefaciens (Smith and Town) Conn dans l'induction tumorale (Datura stramonium L.)
Ann. Inst. Pasteur 112 445-457 1967

Meins, R.
Evidence for the presence of a readily transmissible oncogenic principle in Crown gall teratoma cells of tobacco
Differentiation 1 21-25 1973

Ménagé, A., Morel, G.
Sur la Présence d'Octopine dans les tissus de Crown gall
C.R. Acad. Sci. 259 4795-4796 1964

Ménagé, A., Morel, G.
Sur la présence d'un acide aminé nouveau dans les tissus de Brown gall
C.R. Acad. Sci. 261 2oo1-2oo2 1965

Milo, G., Srivastava, B.I.S.
RNA: DNA hybridization studies with Crown gall bacteria and the tobacco tumor tissue
Biochem. Biophys. Res. Commun. 34 196-199 1969

Nevis, M.D., Grant, D.W., Baker, R.R.
Ribunuclease-induces alterations in Agrobacterium tumefaciens
Phytopathology 60 381-383 1970

New, B.P., Kerr, A.
Biological control of Crown gall: Field measurements and glasshouse expreriments
J. Appl. Bacteriol.

Niles, R.M., Mount, M.S.
Chromatin directed ribonucleic acid syntheses
Plant Physiol. 52 368-372 1973

Parsons, C.L., Beardsley, R.E.
Bacteriophage activity in homogenates of Crown gall tissue
J. Virol. 2 651 1968

Pattillon, M.
Quantitative evaluation by reassotiation kinetics of Agrobacterium DNA sequences residing in the genome of a Crown gall tissue culture
J. Exp. Bot. 25 860-870 1974

Paul, D.C., Goff, Ch.W.
Camparative effects of Caffeine, its analogues and Calcium deficiency on cytokinesis
Experimental Cell Research 78 399-413 1973

Pearson, G.G., Ingle, J.
The origin of stress-induced satellite DNA in plant tissues
Differentiation 1 43-51 1972

Petit, A., Delhaye, S., Tempé, J. Morel, G.
Recherches sur les Guanidines des tissus de Crown gall. Misse en èvidence d'une relation biochemique spécifique entre les souches d'Agrobacterium tumefaciens et les Tumeurs qu'elles indusient
Physiol. Veg. 8 2o5-213 197o

Poste, G., Allison, A.C.
Membrane fusion reaction: a theory
J. Theor. Biol. 32 165-184 1971

Poste, G., Allison, A.C.
Membrane fusion
Biochim. Biophys. Acta 3oo 421-465 1973

Quétier, F., Hugeut, T., Guillé, E.
Induction of Crown gall: partial homology between tumor cells DNA, bacterial DNA, and the GC-rich DNA of stressed normal cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 34 128-133 1969

Rasch, E., Swift, H., Klein, R.M.
Nucleoprotein changes in plant tumor growth
J. Biophys. Biochem. Cytol. 6 11-45 1959

Raymond, M.K., Schmitt, G., Galsky, A.G.
Cyclic-AMP phosphodiesterase activity in Crown gall tumor formation
Biochem. Biophys. Res. Commun. 66 222-226 1975

Rikér, A.J., Spoerl, E., Gutsche, E.
Some comparisons of bacterial plant galls and their casual agents
Botan. Rev. 12 57-82 1946

Rosen, O.M.
Preparation and properties of a cyclic 3':5' nucleotide phosphodiesterase isolated form frog erythocytes
Arch. of Biochem. and Biophys. 137 435-441 197o

Rutherford, B., Jenkins, J., Zoorich, N. Galsky, A.G.
The possible involvment of Adenylcyclase and cyclic-AMP phosphodiesterase in the formation of Crown gall tumors on the primary leaves of Pinto beans
Plant Cell Physiol. 17 1111-1117 1976

Salomon, D., Mascarenhas, J.P.
Auxin and cyclic 3':5' adenosine monophosphate during the isolation of chromatin from Avena coleoptiles: effects on cell free sydthesis
Biochem. Biophys. Res. Commun. 47(1) 134-141 1972

Schell, J.
The role of plasmids in Crown gall formation by Agrobacterium tumefaciens
In: L. Ledoux (ed.), Genetic Manipulation with Plant Materials, Plenum Publ. Co. in press 1975

Schilperoort, R.A.
Investigations on plant tumors Crown gall. On the biochemistry of tumor induction by Agrobacterium tumefaciens
Ph. D. Thesis, University of Leiden, Leiden, The Netherlands 1969

Schilperoort, R.A.
Integration of Agrobacterium tumefaciens DNA in the genome of Crown gall tumor cells and its expression
In: Proceedings of Third International Coference on Plant Pathogenic Bacteria, Geesteraus, H.P. (ed), p. 223-238. Wageningen, Centre Agric. Publ. Document., Wageningen 1972

Schilperoort, R.A., Dons, J.J.M., Ras, H.
Charakterization of the complex formed between PS8 cRNA and DNA isolated from A6-induced sterile Crown gall tissue
In: Proceedings of the 2nd John Innes Symposium on Modification of the Information Content of Plant Cells, p 253-268, July 16-19, 1974

Schilperoort, R.A., Meijns, W.H., Pippel, G., Veldstra, H.
Agrobacterium tumefaciens cross-reacting antigens in sterile Crown gall tumors
FEBS Lett. 3 173-176 1969

Schilperoort, R.A., van Sittert, S.J., Schell, J.
The presence of both phage PS8 and Agrobacterium tumefaciens DNA base sequences in A6-induced sterile Crown gall tissue cultured in vitro
Eur. J. Biochem. 33 1-7 1973

Schilperoort, R.A., Veldstra, H., Warnaar, S., Mulder, G., Cohen, J.
Formation of complexes between DNA isolated from tobacco Crown gall tumors and RNA complementary to Agrobacterium tumefaciens DNA
Biochem. Biophys. Acta 145 523-525 1967

Schroth, M.N.
Induction of abnormal outgrowth in Datura by various agents
In: Conference on Abnormal Growth in Plants, DeVay, J.E. and Wilson, E.E. (ed.) p. 36-4o,
Berkeley, California 1964

Schroth, M.N., Moller, W.J.
Crown gall controlled in the field with a nonpathogenic bacterium
Plant Dis. Rep. 6o(4) 275-278 1976

Schultz, J. and Gardener, H.G.
The role of cyclic nucleotides in carcinogenesis
Academic Press, New York - London 1973

Seitz, E.W., Hochster, R.M.
Lysopine in normal and in Crown gall tumor tissue
of Tomato and Tobacco
Can. J. Bot. 42 999-1004 1964

Singer, A.L., Scherwin, R.P., Dunn, A.S., Applebaum, M.M.
Cyclic nucleotide phosphodiesterase in neoplastic
and non neoplastic human mammary tissues
Cancer Res. 36 60-66 1976

Srivastava, B.I.S.
DNA: DNA hybridization studies between bacterial DNA,
Crown gall tumor DNA, and normal cell DNA
Life Sci. 9(II) 889-892 1970

Stoessel, A., Venis, M.A.
Determination of submicrograms levels of Indole-3-
acetic acid
Analytical Biochemistry 34 344-351 1970

Stroun, M.
On the nature of the polymerase responsible for the
transscription of released bacterial DNA in plant
cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 44 571-578 1971

Stroun, M., Auderset, G.
Natural release of nucleic acids from bacteria into
plant cells
(Nature (London) 227 607-608 1970

Stroun, M., Anker, P.
Bacterial nucleic acid synthesis in plants following
bacterial contact
Mol. Gen. Genet. 113 92-98 1971

Stroun, M., Anker, P., Cattaneo, A., Rossier, A.
Effects of the extent of DNA transcription in plant cells and bacteria on the transcription in plant cells of DNA released from bacteria
FEBS Lett. 161-164 1971

Stroun, M., Anker, P., Gahan, R., Rossier, A., Greppin, H.
Agrobacterium tumefaciens RNA synthesis in Tomato cells and Crown gall induction
J. Bacteriol. 106 634-639 1971

Stroun, M., Anker, P., Gahan, P., Sheikh, K.
Bacterial infection due to natural release of nucleic acids from bacteria into plant cells
In: Informative Melecules in Biological Systems, L. Ledoux (ed.), p. 187-192,
North-Holland Publ. Co., Amsterdam 1971

Swain, L.W., Rier, J.P.
Cellular transformation in plant tissue by RNA from Agrobacterium tumefaciens
Botan. Gaz. 133 318-324 1974

Therman, E.
Dedifferentiation and differentiation of cells in Crown gall of Vicia faba
Caryologia 8 325-348 1956

Tourneur, J., Morel, G.
Sur la presence de phages dans les tissu de Crown gall cultives in vitro
C.R. Acad. Sci. 270 2810-2812 1970

Tourneur, J., Morel, G.
Bacteriophages et Crown gall. Resultats et hypotheses
Physiol. Veg. 9 527-539 1971

Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M.,
Van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R.A.,
Schell, J.
Large Plasmid in Agrobacterium tumefaciens essential
Nature (London) 252 169-171 1974

Vandepeute, J., Huffacker, R.C., Alvarez, R.
Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in
Barley seeds
Plant Physiol. 52(3) 278-282 1973

Wendt-Gallitelle, M.F. and Dobrigkeit, I.
Investigations implying the invalidity of Octopine
as a marker for transformation by Agrobacterium
tumefaciens
Z. Naturforsch. 28c 768-771 1973

White, P.R., Braun, A.C.
A cancerous neoplasm of plants. Autonomous, bacterial
free gall tissue
Cancer Res. 2 597-617 1942

Yasuzumi, G., Shirai, T.
Die Feinstruktur des Kerns im elektronenmikroskopischen
Bild: VIII: Wahrscheinliche Herkunft und Funktion der
in praecancerösen und degenerierten Zellkerne auf-
tretende Nuclearkörper
Cytobiologie 11(1) 3o-43 1975

Zaenen, I., Van Larebeke, N., Teuchy, H.,
van Montagu, M., Schell,J.
Supercoiled circular DNA in Crown gall inducing
Agrobacterium strains
J! Mol. Biol. 86 1o9-127 1974

Zimmermann, H., Rüdiger, W.
Bestimmung des Wuchsstoffes Indolylessigsäure (IES) aus Hafer-Keimlingen auf Dünnschichtplatten
Z. Pflanzenphysiol. 78(3) 236-244 1976

Zimmermann, H., Siegert, Chr., Karl, R.
Veränderung des Wuchsstoffes Indolyl-3-Essigsäure bei der Keimung von Avena sativa L.
Z. Pflanzenphysiol. 80(3) 225-235 1976

Lebenslauf

Am 18.2.1947 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. med. Joachim Kirchhoff, und seiner Ehefrau Dr. med. Erika Kirchhoff, geb. Urnau, in Unterlauchringen geboren. Von 1953 bis 1958 besuchte ich die Volksschule in Unterlauchringen, 1958 Eintritt in das Gymnasium Waldshut, 1962 Übertritt in die Schwarzwaldschule Triberg; 1967 legte ich die Reifeprüfung ab.
Ab dem WS 1967/68 war ich an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen immatrikuliert, zuerst mit Studienziel der Diplomprüfung im Fach Chemie, ab WS 1968/69 mit dem Studienziel des Staatsexamens in den Fächern Biologie und Geographie. Im WS 1972/73 legte ich das Staatsexamen im Fach Geographie ab, im SS 1973 im Fach Biologie. Im Januar 1974 gab ich meine Zulassungsarbeit über "Die Rolle von cyclischem 3':5' Adenosin-Monophosphat (cAMP) und Phosphodiesterase (PDE) bei der Induktion von Pflanzentumoren durch Agrobacterium tumefaciens (Stamm B6k)" ab. Anschließend war ich Doktorand bei Herrn Prof. Dr. B. Schwemmle und bearbeitete das Thema: "Versuche zur Entstehung und Charakterisierung von Tumor- und Kallusgewebe bei Bryophyllum daigremontianum und Helianthus annuus."
Von August 1977 bis Januar 1979 war ich Studienreferendar am Seminar Esslingen. Als Assessor des Lehramts bin ich seit Februar 1979 am Aufbaugymnasium Saulgau tätig.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren Ammermann, Bentrup, Blume, Bünning, Engelmann, Grell, Hager, Karger, Krüger, Kulzer, Mägdefrau, Metzner, Möhres, Müller, Peters, Pfeiffer, Rüdorff, Schönnamsgruber, Schröder, Schwartz, Schwegler, Schweizer, Schwemmle, Seyffert, Varjú, Westphal, Wilhelmy, Winkler, Zähner, Zimmermann.

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (07472) 22145